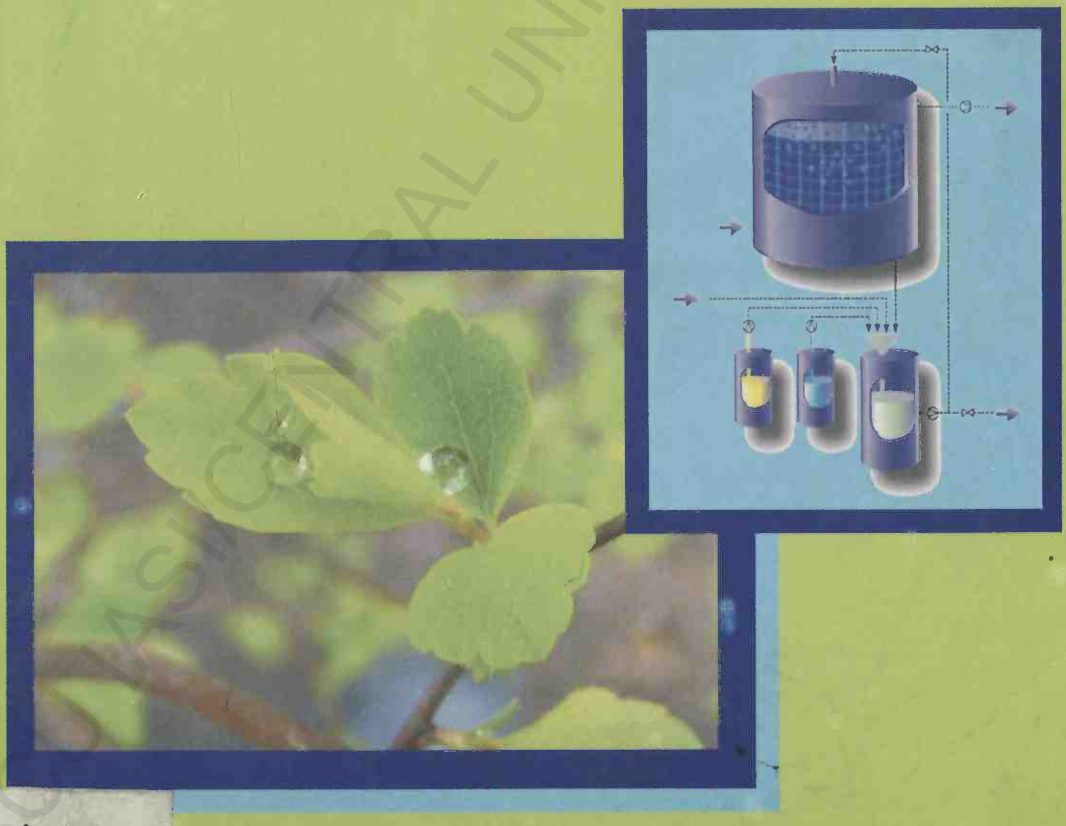
IRINA VOLF

ELEMENTE DE BIOTEHNOLOGIE ȘI BIOREMEDIERE



III 296.394

editura pim

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BIBL. CENTR. UNIV.
„M. EMINESCU" IAȘI
III 296.397

BCU IAȘI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IAŞI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IAS/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

dr. ing. IRINA VOLF

502742

ELEMENTE DE BIOTEHNOLOGIE ŞI BIOREMEDIERE

ALE

434958
B.C.U. IASI

Editura PIM
IAŞI, 2007

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Referenți științifici:

Prof. univ. Dr. ing. Valentin I. Popa
Universitatea Tehnică „Gh. Asachi" Iași
Facultatea de Inginerie Chimică și Protecția Mediului

Prof. univ. dr. ing. Matei Macoveanu
Universitatea Tehnică „Gh. Asachi" Iași
Facultatea de Inginerie Chimică și Protecția Mediului

EDITURĂ ACREDITATĂ CNCSIS BUCUREȘTI
66/01.05.2006

Descrierea CIP a Bibliotecii Naționale a României
VOLF, IRINA
Elemente de biotehnologie și bioremediere / Irina Volf. - Iași : PIM, 2007
Bibliogr.
ISBN 978-973-716-768-2

57:62:504.06

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

24 OCT. 2008

Cuvânt înainte

Daca inițial, chimia a pus la dispoziția biologiei cunoștințe și metodele sale de investigație, în special cele de analiză, fapt ce a dus la apariția biochimiei, în ultimele decenii asistăm la un fenomen invers și anume, chimia caută să se "inspire" din reacțiile care se petrec în materia vie la nivel celular, spre a le folosi și aplica la scară industrială. Apar astfel biotehnologiile care sunt principial deosebite de tehnologiile chimice prin aceea ca utilizează fenomene biologice de transformare a materiei.

Ca urmare, asistăm astăzi la revizuirea conceptelor tehnologice și la reexaminarea modului în care în natură se realizează cele mai complicate transformari, cu un consum minim de energie și cu eliminarea totală a produselor secundare nedorite.

Succesul dezvoltării în afara restricțiilor va fi asigurat, pe de o parte de reorientarea multor ramuri industriale spre exploatarea resurselor vegetale regenerabile, iar pe de altă parte de translarea la scară industrială a unor procese care au loc în natură, sau a unor secvențe ale acestora, pentru a obține produsele dorite. Acestea sunt motivele pentru care procesele biotehnologice se aplică cu mult succes în protecția mediului, în tehnologii de tratare a apelor, aerului și solurilor, în procese de recuperare din deșeuri a unor produse utile, în procese de conversie în energie a unor materii prime regenerabile.

Problematica tratată în acest volum reprezintă doar câteva exemple de realizări în domeniul biotehnologiei în protecția mediului. Unele dintre aceste aspecte sunt utilizate la nivel industrial iar altele pot sta oricând la baza dezvoltării unor aplicații pe scară largă.

Acest volum se adresează studenților de la specializarea Ingineria și Managementul Mediului (I.M.M.) a Facultății de Inginerie Chimică și Protecția Mediului, precum și specialiștilor care își desfășoară activitatea

BCU "GHEORGHE ASACHI" IAȘI UNIVERSITY LIBRARY

în laboratoare cu preocupări în prevenirea şi combaterea poluării. Deoarece studenţii specializării I.M.M. urmează şi disciplina de Tehnologii şi biotehnologii de epurare a apelor, volumul de faţă nu include şi aspecte legate de procese biotehnologice aplicate la epurarea apelor uzate.

Sper ca, prin conţinut şi prin modul de prezentare, lucrarea să constituie un auxiliar util activităţii de pregătire teoretică a celor interesaţi.

Fiind prima ediţie în care se tratează elemente de biotehnologie şi bioremediere a factorilor de mediu, observaţiile constructive ale cititorilor, menite să contribuie la îmbunătăţirea lucrării, sunt aşteptate cu interes.

Autoarea

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Cuprins

		Pag.
	Introducere	7
	Clasificarea şi obiectul disciplinelor biotehnologice	10
Cap. 1	**Introducere în lumea "viului"**	17
1.1	**Structura celulară - unitatea de bază a "viului"**	17
1.2	**Biomolecule**	20
1.2.1	Lipide	20
1.2.2	Protide	21
1.2.3	Acizi nucleici	23
1.2.4	Glucide	26
1.4	**Legături chimice implicate în structurile biomoleculare**	28
1.5	**Reacţii şi procese specifice organismelor vii**	33
1.5.1	Reacţii de oxido-reducere. Stocarea energiei suplimentare	33
1.5.2	Cataliza enzimatică. Echipamentul enzimatic	36
1.5.3	Reacţii de anabolism şi catabolism	39
Cap. 2	**Etapele elaborării unui proces biotehnologic**	41
2.1	**Tipuri de microorganisme utilizate în biotehnologii**	42
2.2	**Izolarea şi selecţia microorganismelor**	48
2.3	**Cultivarea microorganismelor**	53
2.3.1	Medii de cultura. Compoziţie şi rolul principalelor componente	53
2.3.2	Creşterea şi multiplicarea bacteriilor	56
2.3.3	Evoluţia unei culturi bacteriene	60
2.3.4	Dinamica procesului de creştere la mucegaiuri	65
2.4	**Tehnici de înmulţire a microorganismelor**	67
2.4.1	Tehnici de laborator	69
2.4.2	Procedee pilot	73
2.4.3	Procedee industriale	79
Cap. 3	**Producerea de energie cu ajutorul microorganismelor. Biocombustibili**	83
3.1	**Obţinerea de biocombustibili din biomasa vegetală prin procese de extracţie şi separare**	92

BCU CLUJ UNIVERSITY LIBRARY

3.1.1 Rezerve de biomasă vegetală accesibile 92
3.1.2 Biocombustibili extraşi din biomasa vegetală 95
3.1.3 Producerea de Biodiesel 102
3.2 Obținerea de biocombustibili din biomasa vegetală prin procese fermentative 109
3.2.1. Producerea de etanol 109
3.2.2 Fermentația alcoolică 116
3.2.3 Producerea bioetanolului din cereale 122
3.3 Producerea de biogaz 128
3.3.1 Definiție şi procedee de recuperare a energiei din reziduuri organice 128
3.3.2 Fermentația anaerobă. Fazele procesului. Bacterii metanogene 130
3.3.3 Factorii care influențează fermentarea metanogenă (digestia anaerobă) 138
3.3.4 Metode de îmbunătățire a performanțelor fermentatoarelor 142
3.3.5 Tipuri de instalații de biogaz 144
Cap. 4 Bioconversia deşeurilor şi subproduselor agricole şi industriale 155
4.1 Bioconversia deşeurilor şi subproduselor agricole şi silvice 155
4.1.1 Natura şi cantitățile de subproduse şi deşeuri 155
4.1.2 Biodegradarea ligninei, celulozei şi hemicelulozelor 158
4.1.3 Obținerea de biomasă din deşeuri celulozice 166
4.2 Biosolubilizarea accelerată a metalelor grele din „steril". Biosorbția 168
4.3 Asociații de microorganisme cu potențial de biodegradare a hidrocarburilor 179
4.3.1 Specii de microorganisme izolate din soluri contaminate cu reziduuri petroliere 179
4.3.2 Obținerea de biomasă microbiană din petrol 181
4.3.3 Obținerea de biomasă microbiană din metan 187
Cap. 5 Biotehnologii de depoluare şi remediere a solului 188
5.1 Surse de poluare a solului 188
5.2 Microorganismele din sol ca participanți în procesele de depoluare 189
5.2.1 Bacteriile din sol. Factori care condiționează 192

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

activitatea bacteriilor din sol
5.2.2 Actinomicetele şi ciupercile din sol 197
5.3 **Mecanisme de biodegradare a poluanţilor solului** 200
5.3.1 Degradarea aerobă a compuşilor organici 201
5.3.2 Degradarea anaerobă a compuşilor organici 206
5.3.3 Degradarea mixtă a poluanţilor organici persistenţi 209
5.3.4 Mecanismul imobilizării poluanţilor organici şi anorganici 210
5.4 **Biotehnologii de decontaminare şi remediere a solurilor poluate** 212
5.4.1 Tratamentele biologice *in situ* 217
5.4.2 Tehnici de remediere *ex-situ* 237
Cap. 6 **Biotehnologii de depoluare a fluxurilor gazoase** 245
6.1 **Principiul şi tehnicile de biofiltrare** 246
6.1.1 Structura instalaţiei de biofiltrare 247
6.1.2 Variante tehnologice de purificare a gazelor reziduale prin metode biologice: biofiltre, biofiltre cu percolare, bioscrubere 251
6.2 **Factori care influenţează procesele de biofiltrare** 260
Bibliografie 264

BCU IAŞI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IAȘI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

INTRODUCERE

Este aproape unanim acceptată ideea că omenirea se află în plină revoluţie biotehnologică. Ultimii douăzeci de ani au fost martorii elaborării unor noi tehnologii în urma cărora rezultă medicamente noi pentru tratamentul diferitelor maladii, modificarea fondului genetic al plantelor şi animalelor, sau izolarea şi selecţionarea de bacterii cu rol de îndepărtare a unor reziduuri toxice. Niciodată în istoria lumii, "biologicul" nu a fost atât de important, valoros şi comod de utilizat.

Dar dezvoltarea unor asemenea produse şi practici are şi potenţiale aspecte negative. Cum poate fi însă estimat riscul aplicării sau dezvoltării unei tehnologii necunoscute şi ce cuantum din acest risc poate fi considerat acceptabil? Aceste întrebări au o importanţă cu totul particulară pentru domeniul biotehnologiei, pe de o parte datorită faptului că unele realizări biotehnologice implică sănătatea umană şi pe de altă parte pentru că multe dintre consecinţele extreme ale acestor procese pot surveni după o lungă perioadă de latenţă.

In mod general, **tehnologia** reprezintă aplicarea cunostinţelor ştiinţifice, a abilităţilor, a resurselor materiale şi financiare pentru realizarea unui scop. Descoperirile importante din domeniul ştiinţelor biologice au permis extensia utilizării viului ca instrumente şi resurse. **Biotehnologia** reprezintă deci aplicarea principiilor biologice precum şi utilizarea diferitelor organisme şi produse pentru realizarea scopului propus. De altfel, procesele biotehnologice sunt la fel de vechi ca şi

BCU "SPIRU HARET" UNIVERSITY LIBRARY

civilizaţia, oamenii preparând pâine, vin, branză sau cultivând plante şi crescând animale folositoare, de secole. Toate aceste procese utilizează "viul" sau materiale provenind de la lucrurile vii. Dar biotehnologia poartă în acelaşi timp şi însemnele unei ştiinte noi, pentru că unele dintre cele mai performante instrumente şi tehnici de lucru au fost dezvoltate în ultimii zeci de ani, ca rezultat al unor ştiinte diferite - biologia, chimia, fizica şi altele.

Pe la jumătatea anilor '60 se vorbea tot mai des despre naşterea unei "noi biologii" capabilă, prin aplicaţiile sale, să producă o schimbare fundamentală a procedeelor de fabricare a unui mare număr de substanţe chimice şi farmaceutice. Inmulţirea descoperirilor din boichimie, genetică, biologie moleculară şi celulară, între anii 1970-1980, aduce aceasta "revoluţie" la ordinea zilei. La originea acestor speranţe se află, în primul rând, elucidarea structurii şi funcţiilor câtorva enzime, precum şi utilizarea lor, în forma imobilizată, în diverse procese de producţie industrială. In al doilea rând s-a situat descoperirea, de către specialişti în genetica moleculară, a tehnicilor de modificare şi de transfer al ADN-ului în organisme.

Intr-adevăr, cunoştinţele şi tehnicile ingineriei genetice au putut fi reunite şi puse la punct abia în urma progreselor determinante realizate în virusologie (cercetări pe bacteriofagi), în bacteriologie (investigaţii extinse şi asupra fiziologiei, geneticii şi biologiei moleculare a colibacilor precum şi a plasmidelor), în genetica moleculară (cod genetic) şi în enzimologie (enzime de restricţie). In acelaşi timp deveneau clare şi aplicaţiile posibile ale acestor tehnici.

Biotehnologiile constau, de fapt, în utilizarea bacteriilor, levurilor şi celulelor animale şi vegetale de cultură, al căror metabolism şi a căror

capacitate de biosinteză sunt orientate către fabricarea substanţelor specifice. După definiţia propusă de **Federaţia Europeană de Biotehnologie**, creată în 1978, biotehnologiile, datorită aplicarii integrate a cunoştinţelor şi tehnicilor de biochimie, microbiologie, genetică şi inginerie chimică, permit, în plan tehnologic, obţinerii unor avantaje de pe urma proprietăţilor şi capacităţilor microorganismelor şi culturilor celulare. Ele oferă posibilitatea de a produce, pornind de la resurse larg disponibile şi care se reînoiesc continuu, o mulţime de substanţe şi compuşi esenţiali pentru viaţă şi creşterea nivelului de trai al oamenilor.

Evoluţia de o asemenea anvergură a acestei noi ştiinţe interdisciplinare nu poate fi însă separată de etapele vastei întrepinderi care constă în elucidarea progresivă a mecanismelor fundamentale ale vieţii.

In 1953, structura completă a unei proteine, insulina, era stabilită de Sanger, în timp ce Crick şi Watson arătau că acidul dezoxiribonucleic (AND) avea o structură dublă-elicoidală. In 1963, Nirenberg a descifrat codul genetic al cărui caracter general se aplică de la bacterie până la om. Devenea astfel accesibil mesajul ereditar şi semnificaţia sa, şi anume relaţia între codul genetic şi structura proteinelor.

O a doua etapă a fost parcursă de-a lungul anilor '60, atunci când se determină, în mod automat, structura proteinelor ca urmare a ameliorării tehnicilor de analiză ale lui Sanger şi a metodelor de degradare a proteinelor ale lui Edman şi Begg (1967). Au fost apoi realizate aparate capabile să determine secvenţa aminoacizilor din structura proteinelor. In 1978, secvenţele (structura primară) a peste 500 de proteine au fost în felul acesta stabilite şi stocate sub forma unui "atlas de proteine" (Dayhoff şi Eck, 1978).

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

După proteine, a venit rândul acizilor nucleici, iar, în 1976, Gilbert şi Maxam (Universitatea Havard) şi Sanger au pus la punct o metoda rapidă de analiză chimică a AND-ului; se putea astfel determina structura a 1000 de nucleotide pe săptămană (Gilbert, 1981). Devenea aşadar posibilă lansarea pe piaţă, între 1982 şi 1985, a unui echipament automat de analiză a acizilor nucleici (şi deci a genelor). Ca urmare a analizei AND-ului, se putea, de asemenea, deduce, graţie codului genetic, secvenţa proteinelor, a căror sinteză este guvernată de gene.

După analiză, a treia etapă parcursă a fost cea a sintezei. Studiile lui Merrifield (1963) au făcut posibilă realizarea primelor echipamente pentru sintetizarea polipeptidelor. Acestea sunt utilizate în laboratoarele de cercetare şi în industria farmaceutică. Itakura şi colaboratorii săi (City of Hope National Medical Center, Duarte, California) au reuşit, în 1977 şi 1979, să sintetizeze genele somatostatinei şi insulinei umane. Aceste gene au fost introduse în celulele de *Escherichia coli* prin tehnicile de recombinare genetică puse la punct de Boyer şi colaboratorii săi de la societatea Genentech; pentru prima oară s-a făcut demonstraţia expresiei genelor umane în celulele bacteriene (Masters, 2002).

Clasificarea şi obiectul disciplinelor biotehnologice

Aplicate la scară industrială, biotehnologiile constituie bioindustria, ce cuprinde (tab. 1):

- activităţi industriale în care **biotehnologiile pot înlocui tehnologiile clasice;**
- activităţi industriale în care **biotehnologiile au un rol promotor.**

Cele dintâi activităţi cuprind: în domeniul **industriei chimice**, sinteza substanţelor aromatice şi de stimulare a gustului, producţia maselor

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

plastice şi produselor pentru industria de textile; în domeniul **energiei**, producţia de etanol, metanol, biogaz şi hidrogen; în sectorul **biometalurgiei**, extracţia anumitor metale. Activităţile industriale în care biotehnologiile au un rol promotor cuprind industria **alimentara** (producţia masivă de levuri, alge şi bacterii în vederea furnizării proteinelor, aminoacizilor, vitaminelor şi utilizarea enzimelor), domeniul creşterii productivităţii **agricole** (clonare şi selecţie varietală pornind de la cultură de celule şi ţesuturi, bioinsecticide), industria **farmaceutică** (vaccinuri, sinteza hormonilor, a interferonului şi antibioticelor), **protecţia mediului** înconjurător şi lupta împotriva poluării (tratarea apelor uzate şi bioconversia deşeurilor menajere, compostarea, fabricarea compuşilor biodegradabili).

Metodele biotehnologice sunt indispensabile îmbunătăţirii calităţii vieţii, prin diversificarea produselor alimentare, cu proprietăţi organoleptice superioare şi perisabilitate redusă. Biotehnologiile contribuie la valorificarea produselor şi subproduselor agriculturii şi silviculturii, prin înlocuirea unor produse de sinteză cu produse naturale sau succedanee de biosinteză, în contextul „revoluţiei verzi".

Procedeele biotehnologice asigură un sortiment diversificat de proteine monocelulare neconvenţionale, destinate consumului alimentar sau zootehnic. Astfel de proteine se obţin din diferite substraturi: parafine, grăsimi reziduale, zerul de lapte, melase, metanol, reziduuri de la distilerii etc., în prezenţa unor drojdii. Prezintă interes biotehnologiile de obţinere a unor aminoacizi esenţiali: lizina şi acidul glutamic, folosiţi în anumite diete şi ca aditivi alimentari sau zootehnici.

În **industria alimentară** se folosesc enzime, produse prin biotehnologii, precum: amilazele, proteazele, pectinazele, celulazele.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Producerea pe cale biotehnologică a **energiei,** prin intermediul microorganismelor din surse neconvenţionale, constituie un imperativ contemporan. Criza energetică din anii 1970 a adus în atenţie metodele neconvenţionale de producere a energiei, de interes special fiind realizarea fotosintezei prin procedee biomimetice. Subprodusele din agricultură şi deşeurile reprezintă surse de biomasă, utilizabilă pentru producerea de energie. Din **procesul de cultură al plantelor agricole,** de creştere a animalelor, din silvicultură, din industria alimentară se acumulează cantităţi importante de deşeuri celulozice, amidon, melasă, lignină, grăsimi, deşeuri menajere etc. Deşeuri care pot fi valorificate pentru producerea de energie prin procedee biotehnologice, contribuind totodată şi la limitarea poluării mediului înconjurător. De interes este şi producţia de alcool etilic, prin valorificarea biotehnologică a amidonului obţinut din plante cu creştere rapidă sau din cartof, cereale, manioc, trestie de zahăr. Producţia biotehnologică de alcool etilic a fost impulsionată de criza energetică, în scopul valorificării etanolului drept carburant pentru motoarele cu combustie internă. Amidonul, care constituie peste 50% din substanţa uscată a cerealelor sau a altor surse vegetale, pot fi hidrolizat, în prezenţă de enzime sau acizi, cu formare de dextrine şi glucoză, transformate, prin fermentaţie, în alcool etilic.

Celuloza poate fi degradată până la etanol, furfurol şi fenoli cu ajutorul fungilor de tip *Trichoderma reesi,* care conţin celulază.

Hemicelulozele sunt poliozide, aflate în paie, coceni de porumb şi lemnul foioaselor. În prezenţa bacteriei *Thermobacteroides saccharolyticum* hemicelulozele sunt degradate la alcool etilic şi acid lactic.

Producţia de biogaz este o direcţie de valorificare a biomasei, prin fermentaţie metanică sau metanogeneză. Biogazul este un amestec gazos constituit din metan, dioxid de carbon, hidrogen sulfurat şi urme de azot, hidrogen, oxigen şi monoxid de carbon. Metanogeneza este o fermentaţie anaerobă, în care intervin trei categorii de bacterii. Primele transformă substratul organic în acizii butiric, propionic şi lactic. Urmează acţiunea bacteriilor care determină formarea de acid acetic, dioxid de carbon şi hidrogen. În ultimă fază, dioxidul de carbon este redus la metan.

Biotehnologia petrolului - tratarea microbiologică a zăcămintelor de hidrocarburi măreşte cantitatea de petrol extras. Introducerea în zăcământ a unor culturi de microorganisme specifice se soldează cu mărirea presiunii, creşterea porozităţii rocilor şi reducerea vâscozităţii petrolului.

Combaterea poluării cu produse petroliere - producerea, transportul şi depozitarea petrolului pot avea ca efect poluarea mediului, cu repercusiuni majore asupra florei şi faunei. Pentru combaterea poluării cu hidrocarburi se folosesc bacterii din specia *Pseudomonas putida*, care conţin enzime oxido-reducătoare.

Bioexploatarea minereurilor - procesul de recuperare a metalelor cu ajutorul culturilor bacteriene denumit lixiviere poate fi de două tipuri: direct şi indirect. Microorganismele utilizate sunt chimiolitotrofe, obţinând energia necesară proceselor metabolice din oxidarea substanţelor minerale, şi autotrofe, obţinând carbonul necesar sintezei structurilor celulare din dioxidul de carbon. În lixivierea directă, bacteriile atacă, prin enzime specifice, compuşii minerali oxidabili. Bacteriile transferă electroni de la fier sau cupru la oxigen, produşii

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

oxidaţi fiind solubili în medii acide. În lixivierea indirectă, bacteriile oxidează ionul feros Fe(II) solubil la ion feric Fe(III) care este oxidat şi reacţionează cu alte metale, pe care le transformă în ioni oxidaţi, solubili într-o soluţie de acid sulfuric. În acest proces este regenerat ionul feros, care este rapid reoxidat de bacterii. Lixivierea este favorizată de: o aciditate mărită, o temperatură mai ridicată decât cea a mediului ambiant şi aerarea minereurilor. Printre microorganismele pentru lixiviere se numără: *Thiobaccilus ferroxidans*, *Thiobaccilus thiooxidans*, *Thermothrix thiopara*, *Sulfolobus acidocaldarius*, *Sulfolobus brierleyi* etc., procedeul fiind aplicat pentru separarea cuprului, uraniului, zincului, plumbului şi nichelului.

Procedeele biotehnologice pot fi aplicate şi pentru **tratarea apelor reziduale industriale, pentru depoluare şi recuperarea urmelor de metale.** Se folosesc trei tipuri de procese microbiologice şi anume: transformarea chimică a metalelor prin procese biologice, adsorbţia metalelor la suprafaţa microorganismelor şi fixarea intracelulară a metalelor. De exemplu, drojdia de bere *Saccharomyces cerevisiae* şi fungii de *Rhisopus arrhisus* pot extrage uraniul din apele reziduale, în timp ce bacteria *Pseudomonas aeruginosa* poate acumula intracelular metale toxice, în concentraţie foarte mare. Algele din gelurile: *Spirogyra*, *Oscillatoria*, *Rhizoclonium* şi *Chara* acumulează ionii solubili de molibden, uraniu şi sodiu.

Învestigaţii de inginerie genetică au condus la procedee cu eficienţă crescută pentru epurarea apelor reziduale şi recuperarea unor metale preţioase. Printre fixatorii de metale se numără metallothioneina, o proteină care conţine aminoacizi cu sulf, precum şi alge marine din genul *Synechococcus*. Există premise de obţinere a unor microorganisme,

BCU ASIC CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

capabile să genereze proteine fixatoare de metale, aplicabile în scopuri tehnologice sau ecologice.

Direcțiile și exemplele de aplicații ale proceselor biotehnologice sunt mult mai numeroase. Asistăm astăzi la revizuirea conceptelor tehnologice și la reexaminarea modului în care în natură se realizează cele mai complicate transformări, cu un consum minim de energie și cu eliminarea totală a produselor secundare nedorite.

Succesul dezvoltării în afara restricțiilor va fi asigurat, pe de o parte de reorientarea mai multor ramuri industriale spre exploatarea resurselor vegetale regenerabile, iar pe de altă parte de translarea la scară industrială a unor procese care au loc în natură, sau a unor secvențe ale acestora, pentru a obține produsele dorite. Acestea sunt motivele pentru care procesele biotehnologice se aplică cu mult succes în protecția mediului, în tehnologiile de tratare a apelor, aerului și solului, în procese de recuperare din deșeuri a unor produse utile, în procese de conversie în energie a unor materii prime regenerabile.

Problematica tratată în acest volum reprezintă doar câteva exemple de realizări în domeniul biotehnologiei în protecția mediului.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 1

Clasificarea schematică a principalelor produse ale bioindustriei

Tehnologie	Sănătate	Industrii agroalimentare	Agricultură	Energie	Alte industrii	Protecția mediului înconjurător
Fermentații	-antibiotice, vitamine, enzime, aminoacizi, steroizi, reactivi de diagnostic.	-producția de levuri si bacterii pentru industrii alimentare - obținerea de vin, oțet, branzeturi fermentate ; -acid citric; -enzime - biopolimeri.	Biopesticide, -substanțe sau/și tehnici biologice de combatere	-etanol -metanol -biogaz, - hidrogen	-sinteza substanțelor aromate și a stimulatorilor de gust -extracție de metale	-tratarea apelor uzate; - obținerea de biocombustibili, biogaz, bioetanol; -bioconversia deșeurilor și subproduselor; - tratarea fluxurilor gazoase poluate; -obținerea de compuși biodegradabili; - bioremedierea solurilor
Inginerie enzimatică	-	-izoglucoza -sirop de glucoză	--	- etanol		
Recombinări genetice sau inginerie genetică	-interferon -hormoni -vaccinuri	-	-	-	-	-
Culturi celulare	-interferon, vaccinuri, produse ale sangelui, anticorpi monoclonali	-proteine de organisme unicelulare	- clone ale plantelor si animalelor	-	-	-

BCU "MIHAIL KOGĂLNICEANU" UNIVERSITY LIBRARY

CAPITOLUL 1
Introducere în lumea "viului"

1.1. Structura celulară - unitatea de bază a "viului"

Marea diversitate a formelor de viaţă de pe pământ presupune totuşi multe trăsături comune. În mod fundamental toate organismele vii au anumite caracteristici care le diferenţiază de materia nevie. Merită evidenţiate două:

- organismele vii au abilitatea de a se reproduce;
- organismele vii au abilitatea de a-şi extrage energia necesară din mediul în care trăiesc.

Toate organismele vii utilizează acelaşi principiu organizaţional de bază şi anume constituirea din "unităţi de mici dimensiuni". Fiecare "unitate de viaţă", care serveşte ca bază fundamentală a viului, este o entitate în sine şi poartă numele de **celulă.** În forma cea mai simplă, organizarea unei celule constă dintr-un înveliş exterior numit **membrană celulară** ce înconjoară un mediu intern denumit **citoplasmă.** În interiorul celulelor au loc toate reacţiile chimice care servesc procurării energiei din mediul înconjurător, ca şi procesele care asigură creşterea organismului, mişcarea, reproducerea sau alte funcţii. Cum biotehnologiile se bazează în mod fundamental pe procesele ce au loc în interiorul celulelor este necesar ca structura şi organizarea celulară să fie elemente bine cunoscute.

Sunt cunoscute astăzi foarte multe tipuri de organisme dar, în ceea ce priveşte structura celulară de bază, există doar două tipuri diferite de celule:

- **procariote** (fig.1);
- **eucariote** (fig. 2).

Singurele organisme ce conţin celule procariote sunt bacteriile, organisme unicelulare răspândite în mediile cele mai diferite. Toate celelalte organisme chiar şi cele unicelulare, cum sunt levurile sau algele sunt eucariote. Diferenţa esenţială între cele două tipuri de celule, procariote şi eucariote, este modul diferit de organizare interioară.

Fiecare dintre cele două tipuri de celule are la exterior o **membrană**, care îndeplineşte diferite roluri, unul dintre cele mai importante fiind de "barieră" selectivă între interior şi mediul exterior. Celulele procariote au un singur compartiment intern – **citoplasmă** – spre deosebire de cele eucariote care prezintă mai multe compartimente, fiecare dintre acestea fiind delimitat de o membrană proprie.

Stocarea informaţiilor genetice se face la celulele procariote într-o regiune a citoplasmei denumită **nucleoid**, spre deosebire de cele eucariote care prezintă un **nucleu** bine individualizat de către o **membrană nucleară**.

Celulele eucariote şi cele procariote se deosebesc şi prin dimensiunile acestora, primele fiind cu mult mai mari, având diametre de până la zece ori mai mari ca cele din urmă. De asemenea, celulele eucariote se dezvoltă mai încet, se reproduc cu o frecvenţă mult mai mică faţă de cele procariote şi au funcţii specifice cum ar fi transportul oxigenului, transmiterea impulsurilor nervoase şi multe altele. Datorită

BCU IASI CENTRALA UNIVERSITY LIBRARY

acestor funcții specifice celulele sunt organizate în organismele vii, în unități funcționale denumite țesuturi.

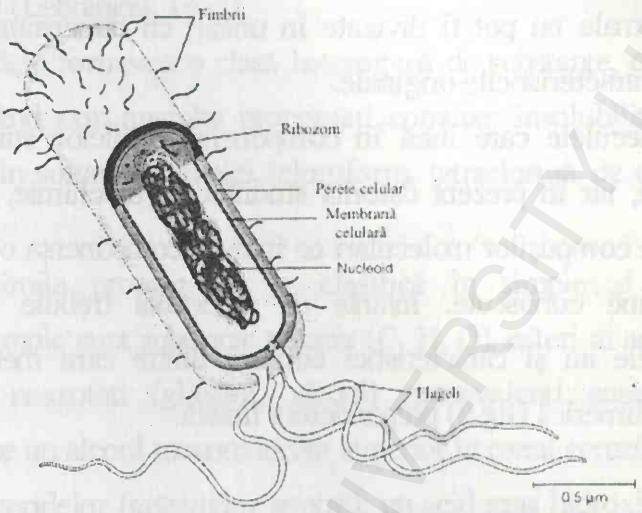


Fig. 1. Celula procariotă

Se observă inexistența compartimentărilor interne iar AND-ul ocupă o regiune a citoplasmei denumită nucleoid.

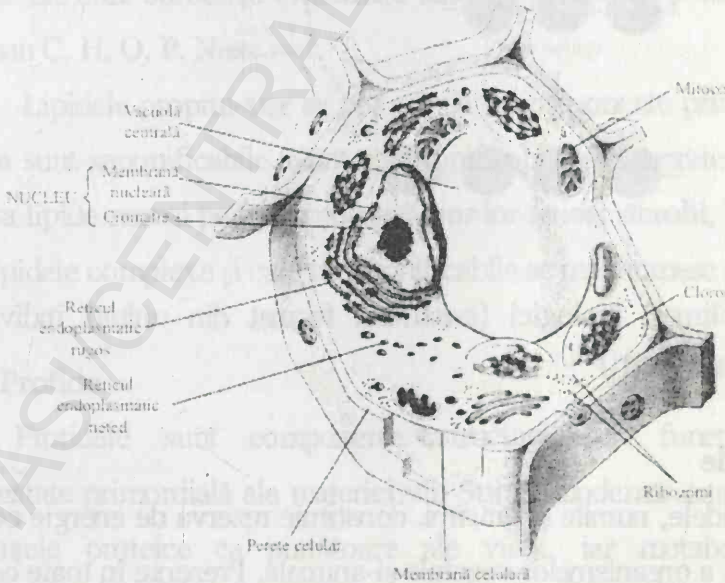


Fig. 2. Celula eucariotă (celulă vegetală tipică)

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1.2. Biomolecule

Moleculele reprezintă din punct de vedere chimic entităţi care în condiţii normale nu pot fi divizate în unităţi cu dimensiuni inferioare menţinând caracteristicile originale.

Moleculele care intră în componenţa celulelor sunt denumite biomolecule, iar în prezent datorită studiilor de biochimie, structura şi proprietăţile compuşilor moleculari ce intră în componenţa organismelor vii sunt bine cunoscute. Înainte de a detalia trebuie precizat că biomoleculele au şi caracteristici comune dintre care merită reţinută structura polimerică (fig.3) preponderent liniară.

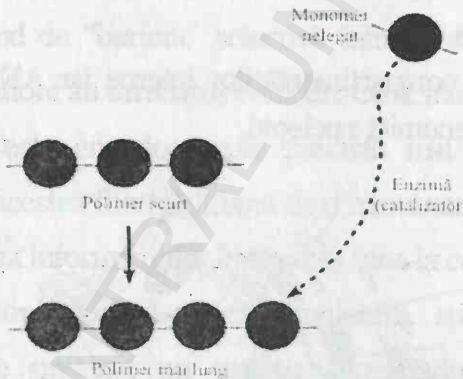


Fig. 3. Polimeri biologici (ansamblu format din unitati individuale denumite monomeri)

1.2.1. Lipide

Lipidele, numite şi grăsimi, constituie rezerva de energie cea mai concentrată a organismelor vegetale şi animale. Prezente în toate celulele (în concentraţii variabile în limite largi) acestea intervin în reglarea

BCU "I.S. CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

permeabilităţii membranelor celulare, în absorbţia şi transportul vitaminelor liposolubile, unii acizi graşi având chiar acţiune vitaminică (vitamine F) (Lehninger, 1987).

Lipidele formează o clasă heterogenă de substanţe, caracterizate în primul rând prin anumite proprietăţi comune: insolubilitate în apă, solubilitate în solvenţi organici (cloroform, tetraclorură de carbon, eter etilic, etc.).

Grăsimile propriu-zise se clasifică în simple şi complexe. Grăsimile simple sunt substanţe ternare (C, H, O), esteri ai acizilor graşi cu alcooli neazotati (glicerol, alcooli monovalenti superiori etc.). Alcoolul este un alcool monooxidrilat superior în cazul cerurilor; glicerol în cazul gliceridelor (grăsimilor neutre); un acid gras hidroxilat în cazul etolidelor şi un sterol la steride. În grăsimile complexe un ester de acid gras este combinat cu alte substanţe care conţin grupări funcţionale variate. Ele sunt substanţe cvaternare sau mai complexe şi conţin C, H, O, P, sau C, H, O, P, N etc.

Lipidele propriu-zise se pot scinda în componente prin hidroliză: acestea sunt saponificabile. Sunt nesaponificabile substanţele clasificate în clasa lipide numai pe baza proprietăţilor lor fizice: sterolii, lipocromii, etc. Lipidele complexe şi cele nesaponificabile se mai numesc şi lipoide.

1.2.2. Protide

Protidele sunt componente structurale şi funcţionale de însemnătate primordială ale materiei vii. Stiinţa modernă caracterizează substanţele proteice ca purtătoare ale vieţii, iar metabolismul ca funcţiunea lor esenţială, din care decurg toate celelalte caractere generale ale materiei vii. În compoziţia elementară a protidelor sunt nelipsite

elementele chimice: C, O, H, N şi (cu puţine excepţii) S, conţinute între următoarele limite procentuale: C= 50,6-54,5 %; O = 21,5-23,5 % ; H = 6,5-7,3 %; N = 15,0-17,6 %; S = 0,32-2,5 %. În protide au mai fost identificate P şi elemente minerale, ca: Fe, Cu, Zn, Co, Mg.

Protidele se găsesc în proporţie mult mai mare în celulele animale decât în cele vegetale. Protidele constituie 45% din masa uscată a corpului omenesc şi numai 1,6% din boabele de orez.

Protidele sunt produşi macromoleculari având ca elemente structurale fundamentale aminoacizii. În grupa protidelor intră aminoacizii (monopeptide) precum şi toţi compuşii chimici care prin hidroliză eliberează aminoacizi (peptide şi proteide) (fig. 4). Proteidele se împart în holoproteide (sau proteine) şi heteroproteide (dacă alături de aminoacizi mai conţin şi componente de altă natură) (Neniţescu, 1980).

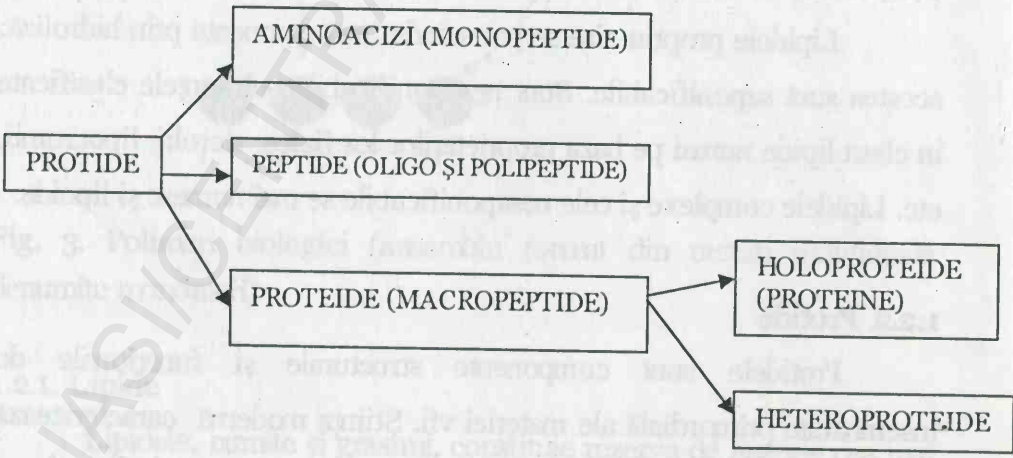


Fig. 4 Clasificarea protidelor

Rolul fiziologic al protidelor este foarte variat şi important. În mod concret:

- sunt cele mai importante constituente plastice ale materiei vii;
- contribuie cu 16% la acoperirea necesarului energetic al organismului;
- extrem de important este rolul lor biocatalitic; ele constituie molecula proteohormonilor si proteoenzimelor şi o serie de factori regulatori sau stimulatori ai proceselor metabolice (Fogarty, 1991);
- formează sisteme tampon foarte sensibile şi eficace;
- au rol de anticorpi în reacţiile imunologice;
- prin presiunea lor osmotică-oncotică, contribuie la menţinerea echilibrului hidric al organismului;
- au rol de coloizi protectori, stabilizând suspensiile şi emulsiile substanţelor greu solubile;
- proteinele plasmatice (în special globulinele) au rol în transportul substanţelor cu curentul sangvin;
- prin modificările lor fizico-chimice intervin în exercitarea unor importante funcţiuni fiziologice: contracţia musculară, transportul de oxigen, etc.;
- nucleoproteidele au rol important în reproducerea materiei vii.

1.2.3. Acizi nucleici

La fel ca protidele, acizii nucleici sunt componente de însemnătate fundamentală ale materiei vii. Prezenţi în toate celulele vii (animale, vegetale, bacteriene) şi în toate virusurile, aceşti compuşi au rol hotărâtor

BCU "SIDENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

în momentele esenţiale ale reproducerii materiei vii: păstrarea, transmiterea la descendenţi şi exprimarea caracterelor ereditare. Cercetările efectuate asupra acestor compuşi au relevat că cele două tipuri distincte de acizi nucleici – **acizi ribonucleici (ARN) şi acizi dezoxiribonucleici (ADN)** – sunt prezenţi în orice celulă vie: ADN preferenţial (dar nu exclusiv) în nucleu (şi în cloroplastele plantelor), ARN masiv în citoplasmă (dar şi în nucleu).

Funcţia esentială a ADN cromozomial este dirijarea genetică a biosintezei proteinelor în citoplasma celulei. Dar aceasta, nu o fac direct, ci conlucrând cu cele trei tipuri de ARN. Informaţia ereditară este transmisă de un ARN mesager de la ADN la organele proteosintezei: ribozomii citoplasmatici, la care aminoacizii proteoformatori sunt aduşi de nişte ARN transportori. Constituienţii nelipsiţi ai ribozomilor sunt acizii ribonucleici ribozomali (Atckinson, 1985).

Componente structurale ale acizilor nucleici. Prin hidroliză, acizii nucleici sunt descompuşi în nucleotide. Fiecare nucleotid este constituit dintr-o **bază azotată, o pentoză** (alcătuind împreună un nucleozid) şi o **moleculă de acid fosforic.**

Bazele azotate pot fi pirimidinice sau purinice. În afară de cele cinci baze principale, componente normale ale tuturor acizilor nucleici, se cunosc şi numeroase baze minore prezente ca elemente structurale rare în molecula unora dintre ei.

Caracterul bazic manifestat în soluţie apoasă de aceste substanţe, este consecinţă a faptului, că ele conţin în moleculă atomi de azot cu electroni neparticipanţi. Dintre bazele azotate principale, citozina, adenina şi guanina fac parte din constituţia tuturor acizilor nucleici. Uracilul se găseşte numai în ARN, iar timina numai în ADN.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Pentoze. Constituente normale ale acizilor nucleici sunt D-riboza (în ARN) şi 2-D-dezoxiriboza (în ADN). În mod excepţional din hidrolizate au fost izolate şi alte pentoze sau substanţe înrudite cu acestea.

Structura acizilor nucleici. Acizii nucleici sunt polimeri ai nucleotidelor. Indiferent de tipul de care aparţin (ARN sau ADN), molecula lor este constituită din lungi lanţuri polinucleotidice. În aceste lanţuri, resturile de acid fosforic formează legaturi diesterice cu câte două molecule de pentoză la atomul de carbon 3' din una şi 5' din cealaltă. Astfel iau naştere catene lungi în care resturile de acid fosforic alternează cu resturile pentozice. Acest schelet este comun tuturor acizilor nucleici, cu deosebirea, că în acizii ribonucleici (ARN) pentoza este riboza, iar în cei dezoxiribonucleici (ADN) dezoxiriboza.

Ceea ce diferenţiază de la caz la caz structura primară a acizilor nucleici este succesiunea bazelor din nucleotide. Acestea formează aşa numiţii radicali laterali ai lanţului polinucleotidic (fig.5).

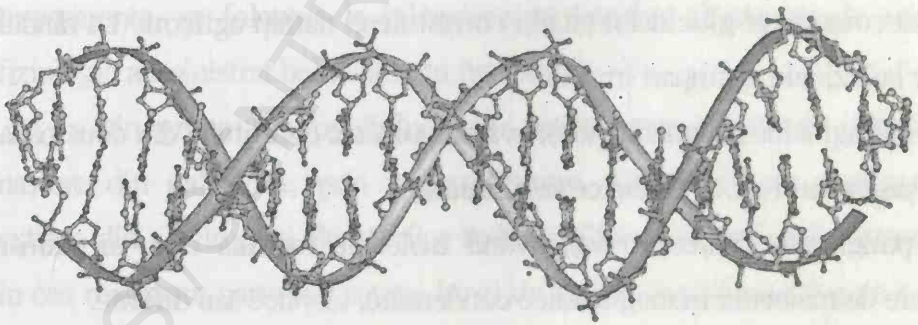


Fig.5. Constituţia acidului dezoxiribonucleic. Structura parţială a helixului dublu, după Watson şi Crick

1.2.4. Glucide

Glucidele (numite şi zaharide sau, cu un termen impropriu, hidraţi de carbon) constituie "combustibilul" principal şi substanţele de rezervă cele mai uşor disponibile ale celulelor. În plus, multe dintre acestea sunt constituente ale substanţelor plastice cu rol de susţinere şi de protecţie la vegetale şi la nevertebrate, respectiv componente ale unor biocatalizatori importanţi. Sunt substanţe ternare, formate din C, H, O; unele dintre ele – aminozaharurile – conţin şi azot.

Glucidele se clasifică în oze şi ozide (fig.6) (Nenițescu, 1980). Ozele se numesc şi monoglucide, monozaharide sau zaharuri simple. Se împart în aldoze şi cetoze. În funcţie de numărul atomilor de carbon din scheletul moleculei (în general neramificat) se disting: bioze (C2), trioze (C3), tetroze (C4), pentoze (C5), hexoze (C6) etc. până la (C10). Ozidele sunt produşi de condensare ai monoglucidelor. Holozidele au molecula constituită numai din resturi monoglucidice, iar heterozidele (glicozidele) sunt compuşi ai glucidelor cu alţi constituienţi numiţi agliconi. La rândul lor holozidele se împart în:

- oligoglucide (oligozaharide), având molecula constituită din două până la şase resturi monoglucidice condensate;
- poliglucide (polizaharide), având molecula formată dintr-un număr mare de molecule monoglucidice condensate, identice sau diferite.

Din grupa homopoliglucidelor, dextranii sunt sintetizaţi în cantităţi mari (sub forma de filamente) de către microorganismul *Leuconostoc mesenteroides* şi alţi microbi înrudiţi, din glucoză sau chiar din zaharoză.

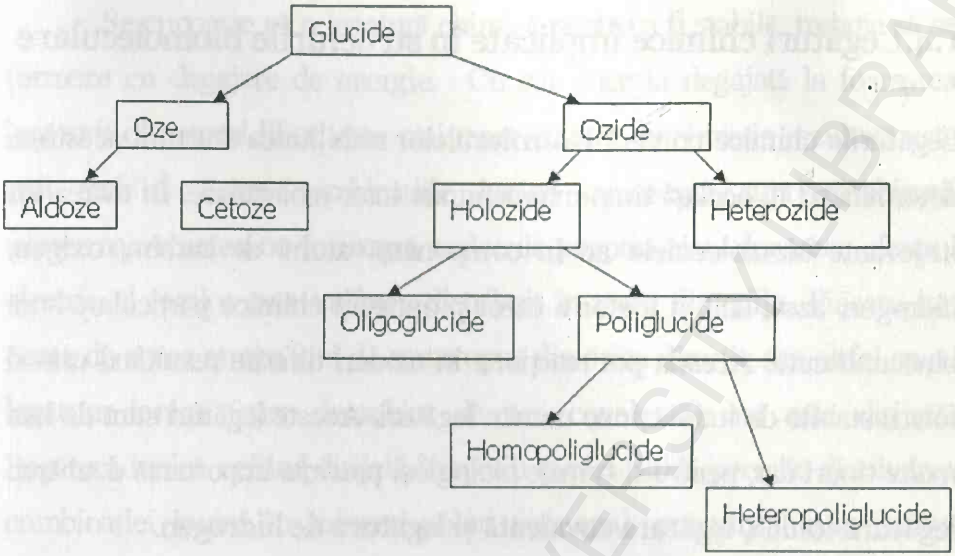


Fig. 6. Schema de clasificare a glucidelor

Dextranii sunt polizaharide puternic dextrogire, cu masă moleculară foarte variabilă. În constituția lor predomină legăturile 1,6-α-glicozidice, greu accesibile enzimelor de origine animală. Pentru acest fapt, dextranii, care în concentrații mai mici de 10% dau soluții apoase perfect transparente, se folosesc la înlocuirea proteinelor plasmatice în serul fiziologic administrat bolnavilor cu hemoragii.

Din grupa heteropoliglucidelor menționăm galactanii care iau naștere din galactoză, prin policondensare. Varietățile de agar-agar, extrase din algele roșii ale Mărilor Indiei și Chinei au molecula formată în cea mai mare parte din catene lungi de D-galactopiranoza, legate 1,3-glicozidic. Agarul este folosit la prepararea mediilor de cultură microbiene. Se folosește și ca laxativ și în industria textilă.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1.4.Legături chimice implicate în structurile biomoleculare

Legăturile chimice conferă biomoleculelor stabilitatea stucturii acestora, determinând în același timp interacțiunile inter-moleculare. În marea lor majoritate biomoleculele au în componență atomi de carbon, oxigen, hidrogen, azot, sulf și fosfor a căror proprietăți chimice particulare sunt binecunoscute. Acestia pot reacționa în moduri diferite rezultând uneori forme stabile de interacțiune numite legături. Aceste legături sunt de mai multe tipuri dar, pentru sistemele biologice, prezintă importanță doar trei: **legătura ionică, legătura covalentă și legătura de hidrogen.**

Legătura ionică apare între un atom ce are capacitatea de a ceda cu usurință electroni și un altul ce poate accepta acești electroni. Se produce astfel un transfer de electroni de la elementul puternic electronegativ, cu potențial de ionizare scăzut, la elementul puternic electropozitiv, cu afinitate ridicată pentru electroni. Ionii astfel formați nu rămân izolați ci se atrag electrostatic între ei, până la o distanță minimă permisă de repulsiile între învelișurile lor electronice. Nu se poate vorbi în cazul combinațiilor ionice de molecule, ci de rețele ionice. Astfel, în rețeaua cristalină a clorurii de sodiu fiecare ion atrage și coordinează în jurul său, la distanță minimă, 6 ioni de semn contrar.
Formarea combinațiilor ionice respectă regulile stabilite empiric de către K. Fajans (1924). Un atom trece în stare ionică cu atât mai ușor, cu cât:

- configurația electronică realizată este mai stabilă;
- sarcina ionului este mai mică;
- raza atomică este mai mare pentru cation și mai mică pentru anion.

Se cunoaşte că o legatură chimică pentru a fi stabilă, trebuie să se formeze cu degajare de energie. Cu cât energia degajată la formarea legăturii din atomi liberi este mai mare cu atât combinaţia rezultată este mai stabilă. Toate combinaţiile ionice cunoscute sunt combinaţii exoterme. Acestea nu formează molecule propriu-zise, deoarece câmpul electric al ionilor este uniform distribuit în toate direcţiile. Fiecare ion poate de aceea atrage ioni de semn opus din orice direcţie sau altfel spus, legătura ionică (spre deosebire de cea covalentă), nu este dirijată. Legătura ionică nefiind dirijată în spaţiu şi nici rigidă permite dizolvarea combinaţiei ionice în solvenţi polari (ex. apa), precum şi substituirea uşoară a ionilor din reţea cu alţi ioni.

Tăria legăturilor ionice trebuie considerată în contextul în care acestea se formează. Pentru sistemele biologice (la care practic toate componentele se găsesc imersate în apă) legătura ionică poate fi caracterizată ca o legătură relativ slabă ce se formează între atomi ce pot, cu uşurinţă, purta sarcini electrice.

Legătura covalentă se realizează prin punerea în comun a electronilor neîmperecheaţi ai atomilor şi conduce la formarea de molecule (agregate de atomi uniţi prin covalenţe) sau reţele atomice.

Covalenţa, spre deosebire de legătura ionică, fiind dirijată în spaţiu, atomii unei molecule ocupă poziţii fixe unii faţă de ceilalţi. Aceste poziţii nu se pot schimba nici chiar prin modificarea stării de agregare, lungimea legăturii şi unghiurile de valenţă fiind caracteristice moleculelor.

În funcţie de natura atomilor care participă la formarea legăturii moleculei, se deosebesc două tipuri de covalenţe:

BCU "ASCENTRALA UNIVERSITARA LIBRARY

- **covalenţa nepolară** stabilită între atomi de acelaşi fel şi caracterizată prin apartenenţa perechii de electroni de legătură în mod egal la cei doi atomi legaţi, de exemplu formarea moleculei de hidrogen sau de clor;
- **covalenţa polară** stabilită între două specii diferite de atomi, caracterizată prin deplasarea de electroni de legătură, către elementul mai electronegativ. Astfel, apar sarcini electrice parţiale, negativă la atomul mai electronegativ şi pozitivă la atomul mai puţin electronegativ.

Covalenţa polară joacă un rol foarte important în stabilirea modelului sau a formelor structurale ale moleculelor biologice şi chiar a funcţionării acestora. Cei mai mulţi aminoacizi, de exemplu, prezintă catene laterale formate cu legături polare.

În concluzie, legătura covalentă are două caracteristici esenţiale care o deosebesc de alte tipuri de legături şi anume: rigiditatea şi dirijarea ei în spaţiul din jurul atomului.

Rigiditatea este caracteristica covalenţei de a se menţine neschimbată în orice condiţii de existenţă a moleculei respective. Desfacerea covalenţei duce la transformarea chimică a substanţei, în timp ce desfacerea legăturii ionice, de exemplu solubilizarea substanţei în apă, nu duce la transformarea chimică a acesteia.

Legătura de hidrogen este un tip de legătură intermoleculară care se realizează între protonii unei molecule şi un atom puternic electronegativ (F, O, N, Cl, etc.) dintr-o moleculă vecină, rezultând asociaţii moleculare, care pot exista în special în stare lichidă şi solidă. Această asociere prin legături de hidrogen determină o creştere a masei moleculare şi deci

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

influenţează unele proprietăţi ca vâscozitate, solubilitate, temperatură de fierbere şi de topire, tensiune superficială, etc. Cele mai bune exemple de legături de hidrogen intermoleculare ne sunt oferite de asociaţiile moleculare ale apei în stare lichidă (fig. 7) sau de gheaţă $(H_2O)_n$ şi ale acidului fluorhidric în toate stările de agregare.

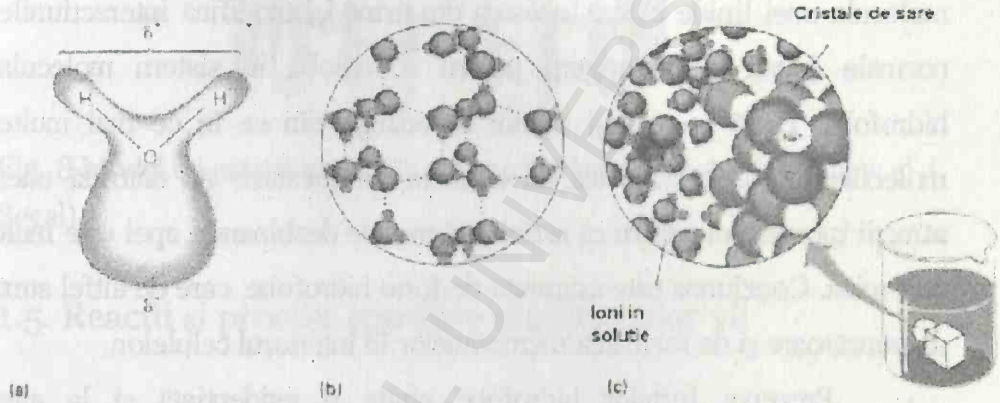


Fig. 7 Legături de hidrogen în apă. (a) Forma şi polaritatea unei molecule de apă. (b) Legături de hidrogen între molecule de apă. (c) Cristal de NaCl solvit în apă – moleculele polare de apă înconjoară fiecare ion protejând sarcina electrică

Exemplul din fig. 7 (c) este foarte sugestiv pentru interacţiunile ce au loc între biomoleculele din compoziţia celulelor şi mediul apos în care acestea există. Toate biomoleculele sunt practic "dizolvate" în apă. Un strat foarte subţire de apă înconjoară fiecare biomoleculă îngreunând uneori interacţiunile posibile între acestea.

BCU "ASIC CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Legăturile de hidrogen sunt foarte slabe în comparaţie cu legăturile covalente dar chiar în aceste condiţii ele sunt instrumente foarte importante care asigură menţinerea unor structuri şi implicit a unor funcţii normale.

Forţe hidrofobe. Natura interacţiunilor hidrofobe poate fi uşor înţeleasă urmărind următorul exemplu: adăugând o moleculă nepolară cum ar fi molecula unei lipide în apă, acestea din urmă îşi modifică interacţiunile normale (punţi de hidrogen) pentru a îngloba în sistem molecula hidrofobă. Dacă în acelaşi mediu se adaugă din ce în ce mai multe molecule hidrofobe, acestea au tendinţa de coeziune nu datorită unei atracţii între ele ci pentru că astfel, puterea de dezbinare a apei este mult mai mică. Coeziunea este asigurată de forţe hidrofobe, care de altfel sunt răspunzătoare şi de formarea membranelor în interiorul celulelor.

Prezenţa fortelor hidrofobe poate fi evidenţiată şi la alte biomolecule ca de exemplu la proteine. Este cunoscut faptul că proteinele sunt constituite din lanţuri de aminoacizi în vecinătatea cărora se pot găsi numeroase grupări hidrofobe. Aflate într-un mediu apos, acestea au tendinţa de a se aglomera. De multe ori, lanţurile proteice se pliază înglobând în centrul acestui edificiu grupările hidrofobe. Pentru o mare parte dintre proteine, cunoscute sub denumirea de proteine globulare, lanţul polipeptidic lung este fragmentat prin cotituri de 180° în segmente paralele, dispuse pe suprafaţa laterală a unui cilindru. De grupările polare libere $-NH_2$, -COOH ale acestora se leagă peptidic segmente liniare. Structura este stabilizată prin legături de hidrogen între segmentele învecinate (fig. 8)

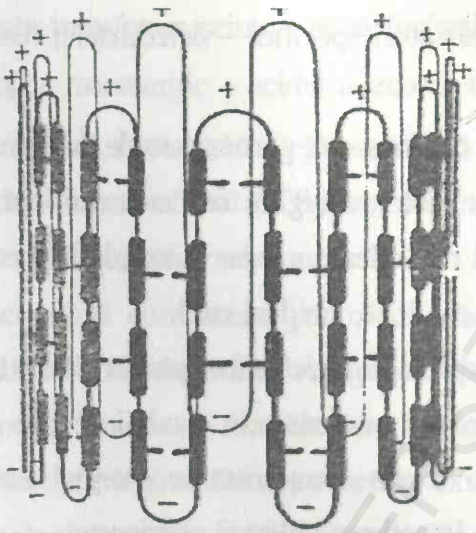


Fig. 8 Model de catenă peptidică pliată cilindric (după A. Kalaidjiew și J. Segal)

1.5. Reacții și procese specifice organismelor vii

1.5.1. Reacții de oxido-reducere. Stocarea energiei suplimentare

Prin oxido-reducere în sens biochimic se înțelege pierderea atomilor de hidrogen (respectiv a electronilor) din molecula unei substanțe care acționează ca donor de H sau electroni (D) și transferul lor la molecula unei alte substanțe care funcționează ca acceptor (A). Aceste reacții de oxido-reducere au un caracter reversibil și pot fi exprimate prin ecuația generală:

$$DH_2 + A \rightleftharpoons D + AH_2$$

Din ecuație rezultă că oxidarea, care se realizează prin captarea a 2 H, este în fond o dehidrogenare. Procesul nu se realizează spontan, ci prin

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

intervenția unor catalizatori specifici – dehidrazele; reacția inversă este cea de hidrogenare.

Procesele de oxidare sunt generatoare de energie. Pentru a obține energia necesară, celulele recurg la oxidarea substraturilor ce conțin atomi de carbon, cel mai adesea a zaharurilor (de la formele simple cum este glucoza până la celuloză, amidon, etc.).

Deoarece oxidarea biologică eliberează în final o mare cantitate de energie, folosirea acestui mecanism în condiții optime se poate asigura prin eliberarea sub formă fracționată a energiei sau prin stocarea excesului de energie în vederea utilizării ulterioare.

Eliberarea sub formă fracționată a energiei este posibilă ca urmare a faptului că reacțiile de oxido-reducere au loc succesiv, sunt catalizate de enzime specifice iar atomii de hidrogen sunt transportați la substratul acceptor, pe calea unui întreg lanț de reacții cuplate. Aceste reacții asigură pe lângă degradarea fracționată și ordonată a substanțelor organice nutritive și folosirea energiei eliberate prin oxidare pentru biosinteză.

Stocarea energiei suplimentare.

Energia suplimentară, eliberată din reacțiile de oxido-reducere, nu se pierde ci este depozitată într-un produs special, din care, la nevoie, poate fi eliberată cu usurință. Acest produs este acidul adenozin trifosforic (ATP).

Compusul derivă din două fosforilări consecutive, de la acidul adenozin monofosforic (AMP). Dacă în molecula de AMP se introduce prin oxidare o moleculă de fosfat anorganic (P), aceasta se leagă de gruparea fosfat a AMP printr-o legătură macroergică și astfel rezultă primul compus macroergic – acidul adenozin difosforic (ADP~), care, la

BCU IASI CENTRALA UNIVERSITY LIBRARY

rândul său se poate transforma printr-o nouă fosforilare oxidativă în cel de al doilea compus macroergic – acidul adenozin trifosforic (ATP~~). Acesta din urmă posedă două legături ~ şi, ca atare, înmagazinează o şi mai mare cantitate de energie. Atât ATP cât şi ADP pot ceda cu uşurinţă fosforul şi în acest caz legătura macroergică ~ se rupe, iar energia sa latentă devine accesibilă consumului pentru diferite nevoi ale celulei. Utilizarea radicalilor fosforici puternic energetici reprezintă o modalitate de obţinere a energiei necesare reacţiilor de biosinteză. ADP şi ATP constituie deci inelul de legătură dintre reacţiile oxidative producătoare de energie şi cele de sinteza care necesită energie (fig.9).

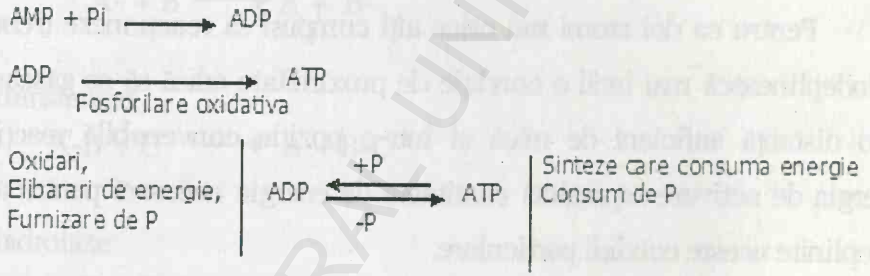


Fig. 9. Rolul ATP în reacţiile de oxido – reducere

Microorganismele chimiosintetizante îşi obţin energia necesară producerii ATP din reacţiile de oxido-reducere producătoare de energie, care au loc în timpul procesului de respiraţie.

În procesele metabolice de tipul fermentaţiei, în care diferiţi compuşi servesc în acelaşi timp ca donor şi ca acceptor de H, în reacţiile de oxido-reducere producătoare de energie, mecanismul obişnuit de formare a ATP este cunoscut sub denumirea de fosforilare la nivelul

substratului. Are loc adiția prin acțiunea enzimatică a P la o substanță în curs de oxidare, cu producerea unei legături macroergice ~ în produsul oxidat. În etapa următoare gruparea fosfat este transferată la ADP cu formare de ATP.

Unele bacterii pot produce ATP pe seama ADP prin intervenția acetil-CoA, după reacția:

$$CH_3\text{-}CO\text{-}CoA + ADP + H_3PO_4 = CH_3COOH + CoA + ATP$$

1.5.2. Cataliza enzimatică. Echipamentul enzimatic.

Pentru ca doi atomi sau orice alți compuși să reacționeze trebuie să îndeplinească mai întâi o condiție de proximitate adică să se găsească la o distanță suficient de mică și într-o poziție convenabilă reacției. Energia de activare reprezintă cantitatea de energie necesară pentru a fi îndeplinite aceste condiții particulare.

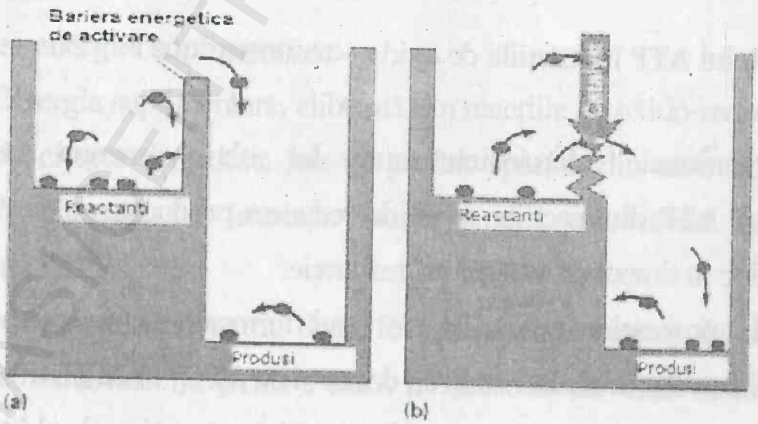


Fig. 10. (a) Energia de activare. (b) Intervenția catalizatorului care micșorează energia de activare

Accelerarea vitezei unui proces sau reacţie determinată de un catalizator, de obicei prezent în cantităţi mici şi care nu intervine în mersul reacţiei, poartă numele de cataliză. Un catalizator permite reacţiei să aibă loc mult mai eficient micşorând energia de activare (fig. 10).

Catalizatorii proceselor biologice sunt denumiţi **enzime.** Aceşti compuşi catalizează orice reacţie chimică ce are loc în interiorul celulelor şi sunt caracterizaţi prin specificitatea lor faţă de substrat şi prin comportarea lor ca acceleratori ai unor reacţii care implică formarea sau scindarea de legături covalente (Oniscu şi colab., 2000, Popa şi colab., 2001).
Din acest punct de vedere enzimele pot fi:

1. oxidoreductaze

$$A^- + B \longrightarrow A + B^-$$

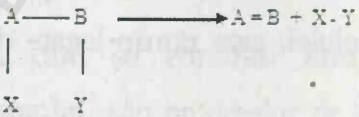
2. transferaze

$$A\text{-}B + C \longrightarrow A + B\text{-}C$$

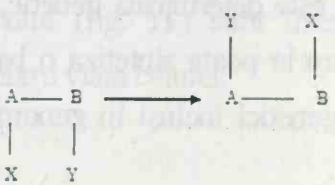
3. hidrolaze

$$A\text{-}B + H_2O \longrightarrow A\text{-}H + B\text{-}OH$$

4. liaze – catalizează separarea unei grupe pentru a forma o legătura dublă sau adiţia unei grupe la legatura dublă.



5. izomeraze



BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

6. ligaze (sintaze)

$$A + B \longrightarrow A - B$$

Multe dintre enzime necesită, pentru a-şi desfaşura activitatea, o serie de molecule mici, numite **cofactori**. Cofactorii pot fi ioni anorganici simpli, cum ar fi Mg(2+) sau molecule organice complexe, cunoscute sub denumirea de coenzime. Cofactorul se leagă strâns la o poziţie specială de pe molecula enzimei. O enzimă la care lipseşte cofactorul esenţial se numeste **apoenzimă**, iar enzima intactă, cu cofactorul legat este desemnată ca **holoenzimă**. După reacţie, enzima se eliberează de substrat pentru a se adsorbi pe o nouă moleculă de substrat (enzima poate cataliza circa 106 reacţii pe minut).

În funcţie de raportul lor cu celula în care s-au format, enzimele bacteriene se împart în două categorii:

- **enzime extracelulare** (exoenzime), în general hidrolaze care de obicei sunt eliberate în mediu;
- **enzime intracelulare** (endoenzime), care rămân în celulă. La rândul lor acestea se clasifică în **enzime solubile**, localizate la nivelul structurilor de suprafaţă, de unde sunt eliberate uşor, în urma distrugerii celulei cu ultrasunete sau materiale abrazive şi **enzime particulate,** legate de constituienţii imobili ai celulei, care rămân legate de resturile celulare după dezintegrarea celulei.

Capacitatea celulei bacteriene de a-şi elabora constituienţii echipamentului enzimatic este determinată genetic. Ca urmare, numărul tipurilor de enzime pe care le poate sintetiza o bacterie este limitat de numărul determinanţilor genetici incluşi în genomul său, care ar fi, în

BCU MUNICIPALĂ UNIVERSITY LIBRARY

medie, de aproximativ 2000. Dimensiunile mici ale celulei bacteriene limitează, la rândul lor, numărul total al moleculelor de enzimă.

Pentru realizarea adecvată a metabolismului său, celula bacteriană dispune de mecanisme de reglare, care ajustează în fiecare moment setul de enzime în activitate ca şi cantitatea relativă din fiecare enzimă, în raport cu nevoile celulei şi ca răspuns la variaţiile mediului extern.

1.5. 3. Reacţii de anabolism şi catabolism

Totalitatea reacţiilor biochimice implicate în activitatea biologică a celulei bacteriene, prin intermediul cărora energia şi elementele biogene, ca atare sau sub forma de combinaţii mai mult sau mai puţin complexe, sunt preluate din mediu şi utilizate atât pentru biosinteza şi creştere, cât şi pentru alte diferite activităţi biologice secundare poartă numele de **metabolism**. Graţie acestor reacţii, substanţele din mediu sunt transformate în constituienţi celulari, energie şi produşi de uzură.

Reacţiile metabolice sunt de două tipuri:

- reacţii prin care se eliberează energie (exergonice), care corespund **catabolismului** sau proceselor de dezasimilaţie, prin care se eliberează energie în urma degradării enzimatice a unor substanţe nutritive din mediu;
- reacţii prin care se consumă energie (endergonice), care corespund **anabolismului**, sau proceselor de asimilare, în care energia este folosită pentru sinteza constituienţilor celulari.

Reacţiile metabolismului (fig. 11) sunt interconectate şi îndeplinesc următoarele funcţii pentru viaţa celulei:

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- producerea subunităților folosite pentru construcția constituienților celulari;
- eliberarea de energie și stocarea acesteia sub forma de ATP;
- formarea constituienților celulari macromoleculari (proteine, acizi nucleici, unele polizaharide) prin polimerizarea monomerilor.

Una dintre caracteristicile distinctive ale activităților metabolice la microorganisme este intensitatea lor excepțională comparativ cu a activităților omoloage ale organismelor superioare (ex. activitatea respiratorie a unui gram – raportat la masa uscată - de bacterii aerobe este de câteva sute de ori mai intensă decât cea a omului).

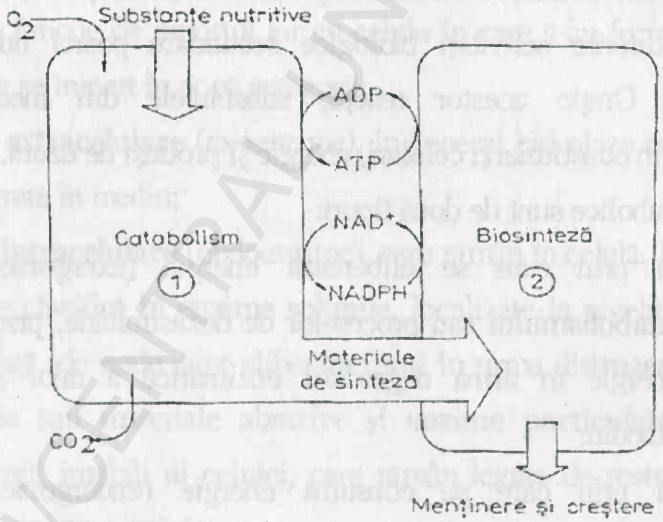


Fig. 11 Reacțiile metabolismului bacterian

Intensitatea activității biologice poate fi explicată prin suprafața mare a celulelor microbiene în raport cu masa lor, fapt care se reflectă în suprafața de contact cu mediul înconjurător.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CAPITOLUL II
Etapele elaborării unui proces biotehnologic

Caracteristica fundamentală a unui proces biotehnologic este obținerea unui produs sau anumitor produse utile prin cultivarea microorganismelor dotate genetic natural să elaboreze aceste produse.

Procesele biotehnologice sunt bazate pe fenomenul de **sinergism** sau **antagonism** al diferitelor specii de microorganisme, ceea ce determină caracteristica fundamentală a procesului ce poate fi realizat în **condiții septice** (când există simbioza) sau **aseptice** (când predomină antibioza).

În general microorganismele elaborează substanțe ce le asigură condiții de viață; aceasta înseamnă că elaborează enzime ce distrug alte specii de microorganisme din mediu, oferindu-le calea de supraveţuire.

La elaborarea unui proces biotehnologic trebuie parcurse următoarele etape:

- izolarea tulpinilor de microorganisme;
- selecția microorganismelor cu maxim de eficiență;
- cultivarea microorganismelor pe un mediu adecvat;
- izolarea produsului de biosinteză;
- stabilirea spectrului de utilizare a produsului obținut, a structurii şi eventual a materialelor de sinteză în scopul comparării rentabilității.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2.1. Tipuri de microorganisme utilizate în biotehnologii

Din punct de vedere chimic, microorganismele sunt foarte asemănătoare celulelor animale superioare şi ele pot fi gazda multor reacţii biochimice de acelaşi fel. În general, microorganismele există ca celule individuale sau, cel mult, colonii multicelulare relativ nespecializate, neavând capacitatea să regleze temperatura celulară. Microorganismele pot fi împărţite în: **protozoare, alge microscopice, bacterii, mucegaiuri, levuri, actinomicete, virusuri şi bacteriofagi.**

Pentru industria biochimică şi alimentară, prezintă importanţă bateriile, levurile şi fungii, inclusiv mucegaiurile şi actinomicetele (Oniscu, 1999). Pentru procesele biotehnologice din protecţia mediului se utilizează tipurile de microorganisme enumerate mai sus la care se adaugă algele şi protozoarele.

Bacteriile sunt microorganisme unicelulare sporulate sau nespolurate şi care se înmulţesc prin diviziune directă. Structura internă a celulei bacteriene, compoziţia chimică (tabel 2) şi metabolismul bacterian sunt noţiuni relativ bine cunoscute şi redate suficient de amplu de literatură (Popa şi colab. 2001). Metabolismul bacterian este însă condiţionat de prezenţa în mediul de cultură a tuturor substanţelor (organice sau anorganice) necesare (atât cantitativ, cât şi calitativ) speciei date pentru sinteza constituienţilor celulari şi pentru obţinerea de energie. Aceasta impune prezenţa în mediul de cultură a unor surse de C, H, O, N, P, S şi în cantităţi mici – surse de K, Mg, Mn, Ca, Fe, Cl, sulfaţi, fosfaţi şi concentraţii infime de oligoelemente (Zn, Cu, Mo) care sunt indispensabile pentru activitatea catalitică a enzimelor.

Peretele celular, prin structura sa "poroasă", favorizează pătrunderea substanţelor nutritive din mediu, cu excepţia celor insolubile sau a celor care există sub formă de particule. Acele substanţe care nu pot pătrunde ca atare în celulă pot fi degradate în mediu extracelular sub acţiunea enzimelor microbiene localizate la suprafaţa celulei.

Levurile sau drojdiile reprezintă un grup taxonomic eterogen de microorganisme (Looder, 1971) care se prezintă în mod obişnuit şi dominant în formă unicelulară şi au organizarea internă de tip eucariot. Se înmulţesc în mod obişnuit prin înmugurire şi ocazional prin diviziune simplă sau prin procese sexuate în urma cărora se formează asce sau ascospori (Anghel şi colab., 1991).

O caracteristică biochimică şi biologică importantă a levurilor este capacitatea acestora de a produce fermentaţia, întâlnită la mediile care conţin hidraţi de carbon. Drojdia reprezintă de fapt masa enormă de celule rezultată din multiplicarea microorganismelor de fermentaţie pe seama substratului nutritiv care constituie produsul fermentescibil, de unde denumirea de drojdie, echivalentă aceleia de levuri.

Echipamantul enzimatic este foarte complex, ceea ce explică activitatea fiziologică intensă şi variată a celulelor de levuri. Folosesc ca sursa de carbon diferite zaharuri, acizi organici, glicina, intermediari ai metabolismului lipidelor, etc, iar ca sursa de azot produse rezultate din hidroliza proteinelor (peptone, aminoacizi), amoniac, uree. Levurile au nevoie şi de factori de creştere ca tiamina, biotina, inositol, piridoxina şi acid pantotenic. Temperatura optimă de dezvoltare este cuprinsă între 20 şi 30° C, pH-ul optim este 4,5 – 5. În anaerobioza levurile realizează fermentaţia alcoolică a zaharurilor cu producere de CO_2 şi alcool etilic.

Din energia eliberată prin fermentație numai o parte este folosită pentru asimilare, iar restul este transformată în căldură.

În aerobioză levurile oxidează complet hexozele după ecuația:

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \longrightarrow 6\,CO_2 + 6\,H_2O + 700\,kcal$$

În aceste condiții o mică parte din glucidele din mediu furnizează energie, care este utilizată de celule pentru asimilarea restului de substrat, astfel încât, creșterea substanței celulare în aceste condiții este deosebit de intensă în raport cu cea realizată în anaerobioză.

Această comportare metabolică pregnant diferențiată în funcție de prezența oxigenului este folosită în industrie unde se creează, după caz, condiții de anaerobioză atunci când produsul dorit este alcoolul etilic sau condiții de aerare puternică, atunci când este nevoie de masă celulară abundentă din care se prelucrează produsul numit "drojdie de bere".

Fungii sunt larg răspândiți în natură în medii ambiante cu umiditate relativ mai redusă decât cea care favorizează dezvoltarea bacteriilor. Metabolismul fungilor este în esență aerob: ei formează celule (hife) lungi, filomentoase cuprinzând nuclee mari de 4-20 µm, care sunt foarte ramificate și care pot avea sau nu pereți despărțitori. Fungii dispun de capacități pronunțate de degradare și de sintetizare și s-au dovedit a fi surse bogate de acizi organici de importanță industrială (ex.: acid citric, acid gluconic), de numeroase antibiotice (penicilina, griseofurina) și de enzime (celulază, protează, amilază).

Ca toate ciupercile, mucegaiurile sunt plante fără clorofilă, cu structură celulară de tip eucariot (tabelul 2).

Mucegaiurile sunt organisme vegetale heterotrofe incapabile de fotosinteză, care se dezvoltă bine în medii bogate în substanțe organice.

Tabelul 2

Caractere diferenţiale ale bacteriilor şi fungiilor

	Bacterii	Fungii
Tip de organizare celulară	Procariot	Eucariot
Volumul celulei	1-5μ^3	Levuri de 20-30μ^3; la mucegaiuri mult mai mare, greu de definit
Peretele celular	Acid muramic, la care se adaugă acizi teichoici şi la unele grupe acid diaminopimelic	Glucan, manan, chitină, glucan- şi manan- proteină
Membrana citoplasmatică	Nu conţine steroli (cu excepţia *Mycoplasma*, cultivată pe steroli)	Conţine steroli
Nucleu	Nucleoid; absenţa membranei nucleare	Nucleoid; prezenţa membranei nucleare
Citoplasma	Absenţa mitocondriilor şi a reticulului endoplasmatic	Prezenţa mitocondriilor şi a reticulului endoplasmatic
Metabolism	Autotrofe sau heterotrofe aerobe, obligat şi facultativ anaerobe	Heterotrofe; aerobe sau facultativ anaerobe Absenţa autotrofilor şi a anaerobiozei
Sensibilitate la frig	Prezentă	Nedemonstrată fără echivoc
Dimorfism	Absent	Caracteristic pentru unele specii
Sensibilitate la antibiotice şi substanţe chimioterapice	Sensibile la antibiotice antibacteriene; rezistente la antifungice	Sensibile la antibiotice de tip special; rezistente la sulfamide şi antibiotice antibacteriene

BCU IAŞI UNIVERSITY LIBRARY

De obicei fungii utilizează ca sursă de carbon diferite zaharuri, alcooli şi acizi organici, iar ca sursă de azot compuşi organici (peptone, aminoacizi) şi uneori săruri de amoniu şi nitraţi.

Mucegaiurile cresc bine în atmosferă umedă iar pH-ul optim este 5-6 (variaţiile tolerate fiind de pH 2 şi pH 9,6). Unele specii cresc în acid acetic 1 N sau acid sulfuric 2 N, hrănindu-se pe seama impurităţilor din soluţie. Au capacităţi foarte mari şi variate de sinteză şi pot forma în cursul metabolismului lor polizaharide, lipide, acizi organici, pigmenţi, substanţe antibiotice şi substanţe celulare cu înaltă valoare nutritivă, care rămân localizate în miceliu sau sunt eliminate în mediu (tabelul 3). Temperatura lor optimă de dezvoltare este de 22-32°C, cea minimă 5-10°C şi cea maximă de 30-40°C. Aproape toţi reprezentanţii grupului sunt aerobi şi ca atare au nevoie de prezenţa unei concentraţii ridicate de oxigen (Viesturs şi colab., 1991).

Actinomicete reprezintă o grupă de microorganisme cu proprietăţi intermediare între cele ale bacteriilor şi fungilor (Dunca şi Ailiesei, 2004). Formează hife lungi, foarte ramificate, lipsite de pereţi despărţitori; sporii înmuguresc din vârful hifelor aeriene. Celulele sunt mai mici, având un ordin de marime de numai 0,5 – 1,4 μm semănând cu bacteriile.

Protozoarele sunt larg răspândite în apa dulce şi sarată, în sol şi chiar in organismele animale, fiind cunoscute pentru rolul lor foarte important în îndepărtarea bacteriilor din apele reziduale, în biofiltre şi în instalaţiile de nămol activ.

Microorganismele se mai deosebesc în ceea ce priveşte necesarul de oxigen. Fungii, algele şi câteva bacterii sunt **aerobe,** alte câteva bacteriii

BCU ASCENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

sunt strict **anaerobe**, pe când levurile și cele mai multe bacterii se pot dezvolta în ambele situații (**facultativ aerobe**).

Tabelul 3

Constituienti ai celulelor unor microorganisme

Microorganisme	Constituienți ai celulelor	
	Proteine	Acizi nucleici
bacterii	50 – 60 %	20 %
levuri	40 – 50 %	10 %
fungi	20 % (cea mai mare parte de natură enzimatică)	3 %
virusuri		50 %

Microorganismele anaerobe și facultativ anaerobe pot fi cultivate în vase foarte mari, de construcție relativ simplă (vezi 2.4), prevăzute cu dispozitive corespunzătoare pentru amestecarea mediilor de cultură. Microorganismele aerobe sau facultativ aerobe, necesită instalații mult mai complexe.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2.2. Izolarea şi selecţia microorganismului capabil să producă componenta utilă necesară elaborării produsului

Izolarea microorganismului producător se realizează de pe medii foarte diferite cum ar fi fructe, plante, sol, aer, diferite incinte. Microorganismul separat se cultivă pe un mediu minimal solidificat cu agar, gelatină, pectină, CMC sau gel de silice (acesta din urmă în cazul microorganismelor autotrofe care sunt inhibate de substanţele organice). Tehnica de lucru este cea folosită în microbiologie pentru izolarea microorganismelor în cultura pură (Volf, 2005).

Tot în această etapă se urmăreşte evoluţia microorganismelor şi reacţiile ce au avut la acest nivel.

Selecţia microorganismelor

În selecţia microorganismelor, în funcţie de natura componentului ce urmează a fi transformat se folosesc patru metode de bază (Popa, 1994):

1. selecţia naturală a formelor cu importanţă practică;
2. selecţia artificială a formelor care apar prin mutaţie naturală;
3. selecţia artificială a formelor care apar prin mutaţie indusă cu ajutorul mutagenilor;
4. obţinerea de forme folositoare prin hibridare.

Selecţia naturală la microorganisme.

Principiul acestei metode constă în faptul că se încearcă obţinerea unei forme a microorganismului care, în diferite condiţii de mediu, este mult mai productivă în comparaţie cu forma iniţială. În acest caz, trebuie create acele condiţii de cultură în care să se limiteze numărul formelor iniţiale de populaţii.

Prin urmare, testarea însuşirii microorganismelor are loc pe cale naturală, fără intervenţia celui care efectuează selecţia. Această metodă necesită un volum mai redus de lucru şi se foloseşte cu succes atunci când trebuie să se obţină diferite variante, care să crească pe un mediu de cultură nou, obţinându-se astfel tulpini de microorganisme mult mai rezistente faţă de factorii nefavorabili, adaptate la schimbarea temperaturii de cultivare etc.

Practic, pe un mediu de cultură oarecare şi în anumite condiţii de temperatură, pH, etc. se dezvoltă bine şi repede numai un număr mic de microorganisme şi anume cele care sunt cel mai bine adaptate la substrat şi la parametrii mediului. Prin trecerea microflorei iniţiale la intervale scurte de timp pe medii proaspete şi sterile, numărul speciilor se reduce şi după un anumit timp se ajunge chiar la culturi care să cuprindă microorganisme de aceeaşi specie. Trecerile de pe un mediu pe altul trebuie să se facă de îndată ce s-a observat o uşoara dezvoltare a culturii. Astfel, speciile mai puţin adaptate se elimină prin diluare. În faza finală de selecţie naturală se trece la izolarea în cultura pură a speciilor existente. În timpul trecerilor repetate pot să apară mutanţi, mai bine adaptaţi condiţiilor de mediu, decât specia naturală. După izolarea în cultura pură urmează faza de stabilire a condiţiilor fizico-chimice optime de mediu pentru stimularea producţiei de enzime şi eventual de obţinerea de mutanţi mai productivi.

Metoda selecţiei naturale este mult utilizată, dar prezintă următoarele dezavantaje:

- nu întotdeauna microorganismul care se dezvoltă cel mai repede este şi cel mai productiv;

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- prin selecţie naturală se elimină microorganismele care, deşi s-ar dezvolta bine pe mediu, sunt impiedicate să se dezvolte de către microorganismele care secretă substanţe antagoniste.

Selecţia artificială fără folosirea factorilor mutageni (adaptarea).

Este cunoscut faptul că în funcţie de substratul metabolizabil prezent într-un mediu de cultură, microorganismele produc enzime ce pot fi clasificate în două grupe: enzime constitutive şi enzime adaptive (Popa, 1994).

Enzimele constitutive se găsesc totdeauna în celule şi concentraţia lor nu este influenţată de prezenţa sau absenţa din mediul de cultură a substraturilor pe care acestea le metabolizează.

În ceea ce priveşte **enzimele adaptive** se deosebesc:

- **Enzime net adaptive** care nu sunt elaborate de celulă decât în prezenţa substratului. Formarea acestor enzime are loc la scurt timp după contactul celulelor cu substratul specific. Perioada de inducţie este de obicei de ordinul orelor.

- **Enzime adaptive**, care se pot identifica în celulă în lipsa substratului specific, însă în concentraţie mică faţă de cea pe care o au în prezenţa substratului. În majoritatea cazurilor concentraţia acestor enzime creşte de câteva zeci de ori în prezenţa substratului. Prin urmare, aceste enzime ar fi constitutive, biosinteza lor fiind stimulată considirabil de prezenţa substratului.

- **Enzime adaptive care se formează după o lungă perioadă de adaptare** a microorganismului la substrat prin treceri repetate pe acelaşi mediu. Formarea acestor enzime se datoreşte apariţiei de mutanţi ai microorganismului. Deoarece noţiunea de adaptare în microbiologie are

BCU "LUCIAN BLAGA" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

un sens diferit de cel folosit în cazul enzimelor adaptive, se utilizează noţiunea de enzime induse pentru biocatalizatorii din primele două categorii. Enzimele din cea de a treia categorie îşi datoresc formarea apariţiei mutanţilor, deci a modificării eridităţii microorganismului datorită unui inductor specific; prin urmare acestea ar putea fi enzime adaptive reale.

Selecţia artificială prin folosirea factorilor mutageni.

Dat fiind că selecţia fără folosirea factorilor mutageni nu este de cele mai multe ori eficientă, în ultimul timp se apelează tot mai des la utilizarea diferiţilor factori care să grăbească şi să sporească variabilitatea mutaţională pe baza căreia să se efectueze selecţia formelor dorite.

Factorii mutageni provoacă mutaţii, care apar foarte rar în condiţii naturale; mutaţiile induse au un caracter de evantai, conducând la forme cu însuşiri atât în plus cât şi în minus faţă de cele ale microorganismului iniţial.

Mutaţiile reprezintă modificări spontane, cu caracter nedirecţional, care survin la nivel molecular în structura unor determinanţi genetici ai caracterelor eriditare şi care, afectând astfel o parte din informaţia genetică a organismului, duc la construirea unui mutant, diferit de cel normal. În funcţie de modul de apariţie există două feluri de mutaţii:

1 - **mutaţii spontane**, care apar în natură datorită unor cauze necunoscute, în condiţii obişnuite de mediu şi fără intervenţia vreunui factor decelabil;

2 - **mutaţii induse** care se produc sub acţiunea unor factori de mediu ce funcţionează ca agenţi mutageni (de natură fizică sau chimică), în sensul

BCU ASE CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

că măresc ritmul sau viteza de apariţie a unor mutaţii, care oricum s-ar fi produs spontan, dar la intervale mai mari de timp.

Folosirea hibridării pentru separarea formelor de microorganisme utile.

Hibridarea se foloseşte relativ rar în selecţia microorganismelor, deoarece obţinerea mutaţiilor induse este destul de eficientă, iar operaţia de hibridare este posibilă numai la câteva specii cu importanţă practică (Higgins, 1985). Atunci când se foloseşte, **hibridarea are drept scop unirea caracterelor utile de la două tulpini**, sau de a obţine hibrizi cu o exprimare mai activă a caracterului util, comparativ cu cel al ambelor forme părinteşti.

Unirea într-un microorganism a însuşirilor celor doi părinţi se poate face pe două căi:

- În primul rând prin apariţia la hibrid a tuturor caracterelor de la cele două forme, ceea ce este pe deplin posibil, datorită faptului că majoritatea microorganismelor se pot înmulţi vegetativ, înmulţire care frecvent se poate prelungi timp nedefinit.
- În al doilea rând, împreunarea caracterelor părinteşti se poate efectua datorită recombinării, spre care duce meioza sau segregarea mitotică (separarea cromozomilor la diviziunea nucleului).

Astfel, se poate aprecia că în dezvoltarea biotehnologiei un rol deosebit va reveni geneticii care dispune, aşa după cum rezultă din sumarele informaţii prezentate, de mijloace pentru a influenţa un microorganism să realizeze predominant o anumită transformare.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2.3. Cultivarea microorganismelor

2.3.1. Medii de cultura. Compoziţie şi rolul principalelor componente

Mediile de cultură sunt soluţii sau amestecuri complexe apoase ce conţin substanţele necesare creşterii microorganismului şi elaborării produsului dorit. În funcţie de natura componenţilor lor, mediile de cultură sunt:

- sintetice;
- semisintetice;
- organice.

Indiferent de mediul utilizat, microorganismelor trebuie să li se asigure **surse de energie** (hidraţi de carbon), **surse de azot, fosfor, săruri minerale** cu diferite conţinuturi de microelemente.

Hidraţii de carbon. Constituie sursa de energie în toate procesele de fermentaţie. Prin oxidarea biochimică a glucozei de exemplu, se degajă o mare cantitate de energie, din care, o parte este înmagazinată în legăturile macroergice ale adenozintrifosfatului, iar restul este preluată de mediul de cultură.

Reacţiile chimice de la nivel celular care duc la creşterea celulelor si la biosinteza produsului dorit se realizează prin utilizarea energiei eliberate de legăturile ATP-ului. Restul de energie, preluată de mediul de cultură sub forma de căldură, este transferată agenţilor de răcire.

Poate cea mai utilizată sursă de carbon în mediile de cultură este **glucoza.** Dacă se analizează degradarea aerobă şi cea anaerobă a glucozei se pot observa următoarele:

BCU SIBIU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1) Glucoza ($C_6O_6H_{12}$) $\xrightarrow[\text{proces anaerob}]{\text{glicoliză}}$ 2 moli acid piruvic + 2 moli ATP

2) Glucoza($C_6O_6H_{12}$) $\xrightarrow[\text{proces aerob}]{\text{respiraţie}}$ 6moli CO_2 + 6 moli H_2O + 38 moli ATP

38 moli ATP = 1112 Kj = 40%

Se constată că 40% din energia furnizată în procesul de degradare aerobă a glucozei este utilizată în proces, restul de 60% fiind preluată de agentul termic.

Lactoza este utilizată de microorganisme mult mai lent decât glucoza, furnizând mai puţină energie mediului extern. Este de asemenea întâlnită în reţetele de obţinere a multor medii de cultură (Volf, 2004).

Surse de azot. Azotul, fie de natură organică, fie mineral din săruri de amoniu, este utilizat de microorganisme pentru formarea grupelor aminice şi implicit a aminoacizilor, deci a proteinelor, substanţe de bază pentru procesul de creştere a microorganismelor, deoarece intră în structura peretelui celular.

Fosforul. Se întâlneşte mai ales sub formă de grupări fosfat şi intră în structurile macroergice ale metabolismului celular (AMP, ADP, ATP), fiind compus esenţial în transferul de energie la nivel celular.

Substanţe minerale (sodiu, potasiu, mangan, magneziu, zinc). Prezenţa substanţelor minerale în compoziţia unui mediu de cultură este indispensabilă pentru creşterea celulei deoarece afectează direct permeabilitatea membranei şi echilibrul ionic, activează unele sisteme enzimatice celulare şi intră în compoziţia altora.

Antispumanţii utilizaţi frecvent în compoziţia mediilor de cultură sunt uleiuri sau substanţe tensioactive care pot constitui totodată şi surse de lipide.

Precursorii sunt substanţe care conţin în structura lor, sau reprezintă ele însele, o porţiune – cea definitorie – a compusului ce se doreşte biosintetizat. Altfel spus, prin prezenţa lor dirijează procesul de biosinteză către produsul dorit. De exemplu, penicilina G are drept precursor fenilacetamida, iar penicilina V – acidul fenoxiacetic. Precursorii se adaugă în porţiuni, astfel încât să nu se depăşească concentraţia de 0,1 - 0,2 %, limita peste care pot deveni toxici pentru microorganisme (Oniscu şi Caşcaval, 2002).

Factori de creştere. Unele microorganisme au nevoie nu numai de surse de energie, de C, de N, ci şi de anumite substanţe organice oligodinamice esenţiale pentru metabolismul lor, numite factori de creştere. Acţiunea acestora fiind asemănătoare aceleia exercitate de vitamine în metabolismul animalelor superioare, ele au mai fost numite prin analogie şi vitamine microbiene. Factorii de creştere ai unui anumit microorganism sunt acele substanţe pe care microorganismul dat este incapabil să le sintetizeze în cursul metabolismului sau şi în absenţa cărora multiplicarea este imposibilă.

La unele microorganisme factorii de creştere sunt de origine endogenă fiind elaboraţi prin biosinteza în cursul metabolismului celular, astfel încât prezenţa lor în mediu ca substanţe preformate nu este necesară. În schimb, microorganismele care nu au capacitatea de a sintetiza aceşti metaboliţi esenţiali, nu pot trăi decât dacă mediul lor este suplimentat cu factori de creştere, pentru a căror sinteză facultăţile lor metabolice sunt deficitare (Zarnea, 1984).

Acţiunea factorilor de creştere se exercită în concentraţii extrem de mici: de exemplu 10^{-4} M în cazul aminoacizilor şi $10^{-6} - 10^{-10}$ în cazul vitaminelor grupului B.

Factori stimulatori de creştere sunt substanţe care, fără a fi esenţiale pentru supravieţuirea şi multiplicarea unor microorganisme, le accelerează sau ameliorează dezvoltarea atunci când sunt adăugate în mediu (de ex. biotina pentru *S. cerevisiae*). Efectul stimulator al îmbogăţirii mediului de cultură cu aceşti factori se datoreşte faptului că, deşi microorganismele îi sintetizează, biosinteza lor se face într-un ritm prea lent şi în cantităţi care nu pot satisface integral exigenţele unei dezvoltări abundente a culturii.

2.3.2. Creşterea şi multiplicarea bacteriilor

Creşterea bacteriilor

Prin **creştere** în sens biologic se înţelege mărirea coordonată a tuturor componenţilor unui organism uni- sau pluricelular, ca rezultat al adăugării de substanţă nouă. Procesul de creştere depinde de natura şi concentraţia substanţelor nutritive din mediu şi de aprovizionarea continuă a celulei cu energia necesară reacţiilor endotermice de sinteză.

Creşterea bacteriilor este condiţionată de trei **factori:**

- existenţa unor membrane de suprafaţă cu înalt grad de organizare care prin permeabilitatea lor selectivă menţin în celule o concentraţie mare a moleculelor necesare în procesele metabolice;
- prezenţa şi activitatea enzimelor care catalizează transformarea moleculelor aliment în blocuri noi, de construcţie celulară;

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

• acţiunea favorabilă a energiei solare, în cazul microorganismelor fotosintetizante, sau aceea a energiei eliberate prin degradarea moleculelor-aliment, asupra reacţiilor de biosinteză (de anabolism).

Creşterea bacteriilor se realizează prin depunerea uni sau tridimensională de substanţă nouă, ceea ce determină mărirea celulei bacteriene în sensul uneia dintre dimensiunile ei sau în sensul tuturor celor trei dimensiuni – lungime, lăţime, grosime. Mărirea volumului celular se face la bacterii nu numai prin sinteză de substanţă organică, ci şi prin sporirea accentuată a conţinutului lor în apă.

Creşterea bacteriilor se întrerupe când se produce diviziunea celulară. Se pare că activitatea normală a bacteriilor este condiţionată de existenţa unui anumit raport între volumul celulei şi suprafaţa sa. Acest raport se modifică în cursul creşterii celulei bacteriene deoarece în timp ce suprafaţa bacteriilor creşte cu o raţie pătratică, volumul ei se măreşte cu o raţie cubică, ceea ce determină o diminuare relativă a suprafeţei celulare. Aportul de substanţe nutritive devine mai puţin adecvat exigentelor metabolice şi pe de altă parte, odată cu mărirea dimensiunilor celulei, echilibrul ei chimic se alterează. Ca urmare, atunci când disproporţia dintre suprafaţă şi volum atinge un punct critic, raportul lor adecvat se restabileşte prin diviziunea celulei ajunsă la limita ei de creştere. Astfel, diviziunea celulară este o formă necesară de reglare automată a activităţii celulei bacteriene.

Multiplicarea bacteriilor.

Spre deosebire de organismele pluricelulare, la care multiplicarea celulelor duce la mărirea taliei individului, la **bacterii**, ca şi la alte

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

organisme unicelulare, multiplicarea are ca rezultat **creşterea numărului de indivizi**. Acest proces se realizează pe două căi, dintre care una, **diviziunea simplă**, directă sau binară, este practic generală, iar cealaltă, **înmugurirea sau ramificarea** este excepţională, fiind caracteristică numai unui număr relativ mic de specii bacteriene (fig. 12).

Multiplicarea prin **diviziune simplă** este tipică pentru majoritatea speciilor bacteriene atunci când celulele se află în condiţii optime de viaţă; diviziunea simplă constă în scindarea unui individ în două celule noi, care pot fi aproximativ egale (**diviziune izomorfă**) sau inegale (**diviziune heteromorfă**).

Diviziunea bacteriilor se poate face fie prin ştrangulare, fie prin sept transversal.

Diviziunea prin ştrangulare caracteristică bacteriilor în faza "S" se realizează prin îngustarea mediană a celulei, determinată de invaginarea membranei ei citoplasmatice, urmată de creşterea spre interior, tot prin invaginare a peretelui celular. Astfel, fiecare din celulele fiice are câte un perete celular, acestea putându-se separa la sfârşitul procesului.

Diviziunea prin sept transversal este caracteristică bacteriilor în faza "R". La începutul procesului de diviziune, bacteria matură este deja traversată de regiunea mediană de un sept derivat din membrana citoplasmatică. Acest sept este apoi scindat în lungul său de un perete despărţitor care se formează pornind de pe faţa internă a peretelui celular şi care creşte centripet, ca o diafragmă. Cele două celule fiice reunite sunt la rândul lor divizate de un sept derivat din membrana citoplasmatică, astfel încât se formează un grup de patru celule dispuse în mod

BCU "ASPENTRA" UNIVERSITY LIBRARY

caracteristic şi ale căror septuri sunt de asemenea scindate ulterior de noi pereţi celulari transversali.

O altă ipoteză consideră că multiplicarea bacteriilor se face după un mecansim în trei etape succesive (Popa şi colab, 2001) :

- Diviziunea citoplasmei prin intermediul unui sept transversal derivat din membrana citoplasmatică şi dispus perpendicular sau oblic faţă de axul mare al celulei;
- Ştrangularea peretelui celular, la nivelul acestui sept care formează la rândul său un perete transvers pătrunzând prin creştere centripetă în interiorul septului citoplasmatic pe care-l separă în două straturi subţiri; celulele fiice astfel rezultate au nucleu, citoplasmă şi membrane citoplasmatice;
- Separarea efectivă a celulelor fiice prin scindarea peretelui celular comun, urmată de despărţirea lor sub acţiunea forţelor de tracţiune din mediu şi în funcţie de elasticitatea peretelui celular; în unele cazuri peretele celular transvers se formează incomplet, astfel încât la sfârşitul creşterii el nu mai apare ca un disc, ci are aspectul unui inel, iar septul membranos citoplasmatic transvers rămas în regiunea centrală alcătuieşte o plasmodesmă prin care cele două celule rămân în continuare legate.

Multiplicarea prin ramificare sau înmugurire. La unele bacterii se formează o ramificaţie tubulară fină, ca o mică umflătură terminală, care creşte şi devine o nouă celulă ovoidă, după care în mijlocul tubului de legătură se constituie un sept transversal.

Viteza de multiplicare a bacteriilor este excepţional de mare şi se datorează valorii foarte ridicate a raportului dintre suprafaţa şi masa lor,

BCU "LUCIAN BLAGA" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

valoare care este de 400000 ori mai mare decât în cazul omului. Celula bacteriană are o suprafaţă de adsorbţie foarte mare, datorită căreia procesele de asimilare şi sinteză, de creştere şi reproducere se desfăşoară într-un timp foarte scurt.

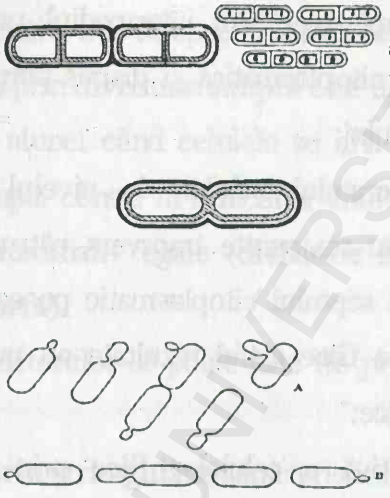


Fig. 12 Reprezentarea schematică a posibilităţilor de multiplicare la bacterii (a) - prin formarea unui sept transversal; (b) – prin ştrangulare; (c) – prin înmugurire laterală (A) şi terminală (B)

2.3.3. Evoluţia unei culturi bacteriene

Dinamica multiplicării populaţiilor bacteriene evoluează în următoarele faze succesive (fig. 13) (Oniscu, 1999):

Faza de latenţă (lag) sau de "creştere zero" este cuprinsă între momentul introducerii celulelor în mediu (însămânţare) şi momentul când ele încep să se multiplice. În cursul acestei faze, numărul bacteriilor din inocul rămâne neschimbat sau chiar scade temporar. Cultura nu este vizibilă macroscopic. Această primă fază (două ore) se observă atunci când bacteriile însămânţate provin din culturi vechi, deci sunt celule

deficitare în enzime sau în produşi intermediari de metabolism. Multiplicarea unor asemenea bacterii devine rapidă în momentul în care aceste substanţe s-au acumulat prin sinteză în concentraţii optime. Dacă inoculul este prelevat dintr-o cultură aflată în curs de multiplicare în aceleaşi condiţii de mediu ca şi cele oferite noii culturi iniţiate, multiplicarea bacteriilor îşi menţine în continuare ritmul rapid. Atunci când bacteriile provin dintr-o cultură exponenţială, dar care creşteau pe alt mediu decât cel în care sunt transferate prin însămânţare, creşterea lor pe noul mediu nu se evidenţiază decât după o perioadă de latenţă necesară inducţiei unor enzime corespunzătoare noului substrat nutritiv. Faza de latenţă apare ca o periodă de adaptare la noile condiţii de cultură în care bacteriile viabile din inoculum îşi acumulează în celulă metaboliţii esenţiali şi sistemele enzimatice necesare creşterii în cazul în care aceste componente biochimice le lipseau datorită condiţiilor de viaţă anterioare însămânţării.

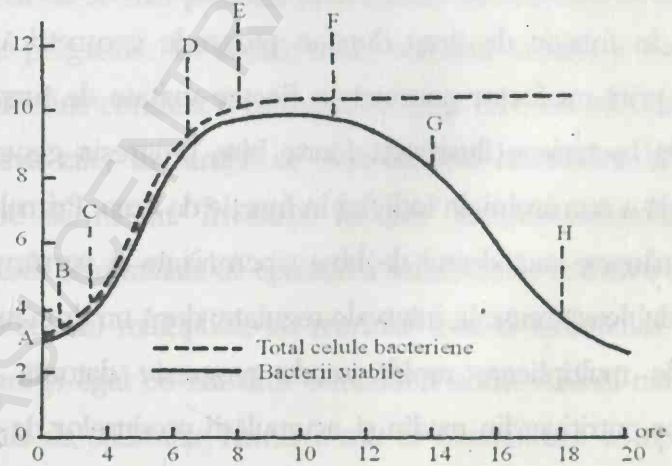


Fig. 13 Curba de creştere a unei populaţii bacteriene în raport cu timpul, exprimată prin logaritmul numărului de bacterii

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

A-însămânțarea; A-B - faza de lag; B-C - faza de accelerare a ritmului de creştere; C-D – faza de multiplicare logaritmică; D-E - faza de încetinire a ritmului de creştere; E-F - faza inițială de declin; F-G - faza intermediară de declin; G-H - faza finală de declin

Faza de multiplicare exponențială sau de creştere logaritmică este caracterizată prin aceea că după o scurtă perioadă (circa două ore) de accelerare a ritmului de creştere, în care multiplicarea se produce cu o viteză progresiv mărită, acest ritm devine constant şi caracteristic pentru un organism dat în anumite condiții de cultură, durata unei generații fiind minimă. Celulele considerate a fi de tip "embrionar" au dimensiuni mai mari decât cele caracteristice speciei, iar citoplasma lor este omogenă, nu conține materiale de rezervă şi are o mare afinitate pentru coloranții bazici datorită conținutului ei ridicat de ARN. Celulele aflate în faza exponențială de multiplicare sunt cele mai potrivite pentru cercetări de genetică şi fiziologie bacteriană.

În condiții ideale de creştere şi multiplicare, cantitatea de materie vie creşte în funcție de timp după o progresie geometrică, adică se multiplică print-un factor constant la fiecare unitate de timp. Evoluția unei culturi bacteriene ilustrează foarte bine progresia geometrică sau exponențială a numărului de indivizi în funcție de timp. Primele diviziuni după însămânțare sunt destul de bine sincronizate şi numărul celulelor viabile se dublează brusc la intervale regulate; după un timp relativ scurt, tendința de multiplicare rapidă scade progresiv datorită epuizării substanțelor nutritive din mediu şi acumulării produselor de catabolism cu efect inhibitor. Creşterea populației bacteriene nu se mai face sincron datorită faptului că în aceste condiții de încetinire a ritmului de creştere

apar unele diferenţe individuale în privinţa timpului de diviziune celulară. Acest fenomen asigură echilibrul organismelor vii în natură.

Creşterea unei populaţii bacteriene se poate aprecia direct prin mai multe metode (Burgeois şi Leveau, 1993): determinarea masei uscate a celulelor, dozarea într-o cultură a unuia dintre constituenţii bacterieni elementari (C sau N), aprecierea cantitativă a unei enzime sau a unui produs metabolic şi evaluarea numărului total al celulelor bacteriene (vii şi moarte) cu ajutorul celulei microscopice de numărat sau a numărului de celule viabile (capabile de multiplicare) prin însămânţare pe medii de cultură solidificate. Ca metode indirecte se folosesc aprecierea gradului de turbiditate a suspensiei bacteriene într-un mediu lichid în raport cu o scară etalon sau la fotocolorimetru, determinarea absorbţiei razelor UV cu lungime de 2800 Å, specifică pentru proteine sau 2500 Å, caracteristică pentru acizii nucleici.

Faza staţionară maximală urmează unei scurte perioade (2 ore) în care multiplicarea nu se mai produce în progresie geometrică, ci într-un ritm care scade progresiv. În acestă fază, numărul celulelor viabile, este maxim şi rămâne constant o perioadă de timp care durează de la câteva ore la câteva zile, în funcţie de sensiblitatea bacteriilor la condiţiile defavorabile de mediu. În cazul în care intrarea culturilor în fază staţionară este determinată de epuizarea substanţelor nutritive din mediu, celulele nu se mai multiplică, iar numărul total al indivizilor populaţiei este constant şi egal cu numărul celulelor viabile. Atunci când apare o lipsă parţială de substanţe nutritive sau se acumulează compuşi toxici, multiplicarea persistă în ritm încetinit, dar este contrabalansată de o mortalitate cu ritm echivalent: numărul celulelor viabile rămâne constant, în timp ce numărul total al bacteriilor din cultură (vii şi moarte) creşte. În

această fază, celulele bateriene sunt considerate "mature" având morfologia descrisă drept caracteristică pentru fiecare specie: dimensiuni mai mici decât în faza de creştere exponenţială, citoplasma mai puţin omogenă datorită apariţiei de incluziuni şi acumulării unor substanţe de rezervă, afinitate moderată pentru coloranţi şi prezenţa sporilor la speciile sporogene.

Faza de declin corespunde unei scăderi progresive a numărului celulelor viabile, până la sterilizarea bacteriologică a culturii; la un moment dat, numărul bacteriilor viabile scade în progresie geometrică în raport cu timpul datorită morţii unui număr foarte mare de celule. Celulele din acestă fază, celulele "bătrâne", au un polimorfism marcant, determinat de prezenţa formelor de involuţie (celulele mici, sferice, umflate, deformate sau ramificate), se colorează foarte slab sau capătă afinitate pentru coloranţii acizi, iar la speciile sporogene apar în cultură foarte mulţi spori. În unele cazuri apar fenomene de liză care determină scăderea numărului de celule din mediu.

Moartea celulelor dintr-o populaţie microbiană reprezentată printr-o cultură pură este un proces care evoluează exponenţial sau logaritmic, deoarece indivizii dintr-o asemenea populaţie reacţionează identic faţă de factorii letali exogeni. Spre deosebire de organismele superioare, la care abolirea pentru o perioadă relativ scurtă a funcţiilor biologice şi a capacităţii de reproducere a celulelor componente determină fenomene de degradare cu caracter ireversibil care produc moartea, la bacterii procesele biologice pot fi parţial sau total suspendate pentru perioade foarte îndelungate, fără ca aceasta să provoace moartea celulelor. Astfel, deşi în spori şi în celulele congelate sau liofilizate activitatea biologică este practic oprită, capacitatea lor de a se reproduce

rămâne intactă. În acelaşi timp, la bacterii este posibilă şi situaţia inversă, în care pierderea capacităţii de reproducere nu este obligatoriu urmată imediat de încetarea activităţilor metabolice. De aceea este mai corect să se aprecieze viabilitatea microorganismelor în raport cu conservarea potenţialului lor de reproducere.

2.3.4. Dinamica procesului de creştere la mucegaiuri.

Creşterea mucegaiurilor poate fi studiată depunând în zona centrală a unei plăci Petri cu un mediu adecvat, câţiva spori sau o porţiune de miceliu fungic. Creşterea este limitată în mod caracteristic la extremitatea liberă a hifelor şi poate continua prin extinderea hifelor periferice, atât timp cât mediul conţine substanţe nutritive. Procesul a fost urmărit la miceliile septate, deşi acelaşi principiu se aplică şi celor coenocitice (Tănase, 2002). După alungirea celulei terminale şi biosinteza peretelui celular, urmează procesul de formare a septului terminal având ca rezultat delimitarea a două celule fiice. Cea apicală continuă ciclul de creştere şi diviziune, pe când celula subterminală participă facultativ la creştere, numai atunci când produce o ramificaţie laterală, dotată la rândul ei cu capacitate de creştere apicală şi diviziune. În unele cazuri, (la unele *Basidiomycetes*) un singur miceliu poate atinge până la 15 m. Pe măsură ce miceliul creşte spre periferie, conţinutul citoplasmei poate să dispară în partea centrală, cea mai veche a coloniei.

Creşterea unui miceliu pornind de la un inocul de spori sau de la un fragment micelian parcurge mai multe faze (Mititiuc, 1995):

Faza iniţială de lag, care durează câteva ore, este caracterizată prin procese de germinare a sporilor sau regenerare a hifelor rupte şi lezate care au servit ca inocul;

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Faza de creștere liniară corespunde perioadei în care pe suprafața mediului apare o colonie circulară ce crește liniar în raport cu timpul. Viteza de creștere se menține constantă la marginea coloniei, în timp ce în zona centrală creșterea este mai lentă sau chiar încetează. Creșterea coloniei în suprafață nu este corelată cu creșterea de masă. În medii sărace în substanțe nutritive colonia se extinde mai repede însă sub forma unei rețele fine de hife, în timp ce pe medii bogate creșterea ei în diametru este mai lentă dar miceliul format este mai gros (Oniscu și Caşcaval, 2002).

Faza de învechire este echivalentă cu încetinirea vitezei de creștere, pe măsură ce colonia se apropie mai mult sau mai puțin de bariera mecanică reprezentată de marginea plăcii Petri, dar ea este de fapt determinată de efectul dăunător al produşilor de metabolism eliberați din colonie. La unele specii ea este însoțită de liza miceliului în centrul coloniei. Încetinirea ritmului de creștere apare mai repede când cultura se dezvoltă în medii bogate în substanțe nutritive și la temperaturi optime și supraoptimale, acumularea produşilor de metabolism făcându-se mai rapid în aceste condiții. Creșterea coloniilor de mucegai pe medii solide evoluează cu o viteză variabilă, în funcție de tulpină, mediul de cultură și factorii de mediu (temperatură, pH, presiune osmotică). La fungii neseptați alungirea miceliului poate ajunge la 3 mm/h la 25°C, astfel că în 2-3 zile colonia poate acoperi o zonă mare. În medii lichide, fungii produc o pânză "miceliană" la suprafața lichidului, astfel că diferitele părți ale culturii se găsesc în diferite condiții de mediu în special sub raportul gradului de aerobioză. De aceea, în procesele industriale în care se urmărește o dezvoltare abundentă și egală a mucegaiului este necesar să se asigure condiții fiziologice omogene de cultivare prin agitare

mecanică şi aerare controlată a mediului. În acest fel se realizează o dispersare a miceliului însoţită de apariţia unor colonii sferice.

2.4. Tehnici de înmulţire a microorganismelor

Un microorganism se înmulţeşte dacă mediul în care se află cuprinde toate substanţele necesare dezvoltării sale: sursă de carbon, azot, săruri nutritive, factori de creştere şi dacă sunt îndeplinite şi anumite condiţii fizico-chimice de umiditate, pH, temperatură, tensiune de oxigen.

Aşa cum s-a arătat anterior, în dezvoltarea microorganismelor se deosebesc mai multe faze (Popa şi colab., 2001):

- faza de inducţie în care nu are loc practic nici o înmulţire şi în care au loc în interiorul celulei transformări metabolice care pregătesc celula pentru înmulţire;
- faza accelerată, în care microorganismul începe să se înmulţească şi viteza de înmulţire este în continuă creştere;
- faza exponenţială, în care înmulţirea are loc exponenţial; populaţia microbiană creşte după o progresie geometrică, aceasta fiind starea normală de creştere a microorganismului;
- faza staţionară în care înmulţirea este în curs de stagnare; numărul celulelor care se formează este în echilibru cu numărul celulelor care mor;

În practica industrială de înmulţire a microorganismelor, faza de înmulţire exponenţială prezintă un interes deosebit deoarece, conducând bine această fază, creşterea masei microbiene are loc rapid, cu

BCU IASI CENTRALA - UNIVERSITY LIBRARY

randamente maxime. Din acest motiv această fază va fi discutată mai amănunţit.

Timpul de generaţie sau timpul unei generaţii este timpul necesar ca populaţia microbiană actuală, în fază de înmulţire exponenţială, să se dubleze; cu alte cuvinte, timpul necesar ca o celulă nou formată să se înmulţească, cu formarea unei celule-fiice identice ei. Timpul de generaţie este dat de durata înmulţirii (t), raportată la numărul generaţiilor, (n).

$$g = t/n$$

În faza de înmulţire exponenţială sau logaritmică, înmulţirea are loc conform progresiei geometrice:

$$a, 2a, 2^2a, 2^3a, 2^4a, \ldots\ldots 2^na$$

în care: (a) este numărul de celule ale microorganismului la timpul zero, în momentul însămânţării mediului proaspăt cu celule în stare de înmulţire.

După (n) generaţii numărul celulelor va fi 2na. Notând cu (b) acest număr rezultă:

$$b = 2^na$$

Prin logaritmare se obţine:

$$n = (\log b - \log a) / \log 2$$

Deci, timpul de generaţie va fi:

$$g = t \times \log 2 / (\log b - \log a).$$

Relaţia permite calcularea timpului de generaţie pentru faza de înmulţire exponenţială prin determinarea numărului de celule sau a masei microbiene la început şi după timpul t de dezvoltare.

Pentru ca faza de înmulţire a unui microorganism să fie exponenţială este necesară asigurarea unor condiţii constante de dezvoltare, care se referă

BCU "SICENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

la concentraţia substanţelor nutritive, condiţiile fizico-chimice (temperatură, pH, tensiune de oxigen) şi eliminarea metaboliţilor rezultaţi din procesul de înmulţire. După cantitatea de oxigen necesară dezvoltării microorganismelor procedeele de înmulţire pot fi **aerobe** şi **anaerobe.** Utilajele folosite pentru înmulţirea în condiţii aerobe se pot folosi şi pentru cele care necesită condiţii anaerobe, în condiţiile îndepărtării oxigenului prin barbotare de gaze inerte sau prin folosire de substanţe tampon de oxido-reducere care să consume oxigenul. De aceea se vor discuta numai procedeele de cultivare a microorganismelor aerobe.

2.4.1. Tehnici de laborator

Tendinţele recente în cultivarea microorganismelor sunt orientate spre experimente care să simuleze cât mai mult condiţiile din natură. De aceea, alături de utilizarea diferitelor specii de microorganisme este necesară folosirea amestecurilor de substanţe nutritive şi modificarea parametrilor de cultivare (durată, temperatură, pH, agitare etc.).

Această situaţie este determinată de faptul că microorganismele care se cultivă în laborator pot folosi alte căi metabolice, comparativ cu cele care cresc în mediile naturale pentru a consuma substratul. În acest din urmă caz microorganismele care se dezvoltă în condiţii de competiţie vor recurge la căi metabolice variate pentru a metaboliza diferite substraturi. Astfel, caracteristicile unui microorganism pentru supravieţuire în mediu natural contrastează cu cele ale celui selecţionat şi cultivat în laborator, ceea ce explică unele rezultate contradictorii. De aceea, suplimentarea continuă a mediului de cultură cu concentraţii mari într-un anumit substrat poate furniza dezvoltarea unui microorganism care poate utiliza mai bine acel substrat.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Metoda culturilor de suprafaţă. Dezvoltarea microorganismelor se realizează în condiţii sterile, pe medii şi în vase sterilizate şi utilizând pentru procesele aerobe aer tehnologic sterilizat (Popa şi colab., 2001).

Sterilizarea se poate realiza prin diferite metode, în funcţie de materialul folosit (tabelul 4). Sterilizarea pe cale termică se realizează timp de două ore la 160-180°C. Aceste condiţii sunt necesare pentru a distruge microorganismele, inclusiv formele vegetative şi sporii. Pentru a degrada endotoxinele produse de bacteriile gram-negative, se recomandă efectuarea sterilizării pentru durate mai lungi (cel puţin 4 ore). Sterilizarea în autoclavă se conduce la o temperatură de 120°C folosind abur sub presiune (15 psi).

Tabelul 4

Metode de sterilizare

Material	Metodă				
	H	A	R	G	F
Metal	*	*	*	-	-
Sticlă	*	*	*	-	-
Policarbonat	-	*	*	*	-
Polietilenă	-	*	*	*	-
Polipropilenă	-	*	*	*	-
Polistiren	-	-	*	*	-
Medii de cultură	-	-	*	-	*
Soluţii de săruri	-	*	*	-	*

H – termic uscat; A- termic în autoclavă; R- radiaţii; G-gaze; F –filtrare; - nerecomandat; * se poate utiliza

BCU IVICENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Sterilizarea cu radiații recomandă folosirea radiațiilor UV (2 ore, 250-270nm) sau iradierea cu radiații γ. Acestea din urmă se utilizează pe scară largă pentru a steriliza materiale plastice şi reactivii liofilizați (doza 2-3 Gy-Gray).

Sterilizarea cu gaze toxice se foloseşte pentru materiale plastice. În acest scop se utilizează oxidul de etilenă. Ca durată, aceasta variază de la 1-2 zile până la 1 săptămână.

Sterilizarea prin filtrare reprezintă o tehnică accesibilă, recomandată în cazul în care componenții unei soluții sunt sensibili la tratarea termică sau cu radiații. Pentru filtrare se impune folosirea unor membrane cu porozități ale căror dimensiuni să excludă trecerea virusurilor (1nm-0,1μm) şi microorganismelor (0,45 -10μm). Aerisirea este asigurată în mod natural printr-un dop de vată care acoperă vasul (eprubete, vase Erlenmayer, baloane cu fund plat, cutii Petri, vase Roux etc.), caz în care schimbul de gaze se realizează destul de lent. În cazul acestor microorganisme (bacterii acetice, mucegaiuri) se folosesc vase de sticlă cu baza mare şi cu un strat subțire de mediu (vase conice de 500 mL care conțin câte 50-100 mL mediu).

Mediile pe care are loc dezvoltarea microorganismelor aerobe pot fi lichide sau solide. Dezvoltarea pe medii lichide poate avea loc la suprafața mediului lichid sau în interiorul său. Microorganismele care se pot dezvolta la suprafața mediilor lichide formează de obicei o peliculă fină sau mai groasă care cade la fund. În locul vechii pelicule se formează o peliculă nouă care cade şi ea, ş.a.m.d. Cu timpul se acumulează la fundul vasului un sediment format din celulele microorganismului. Mucegaiurile, pe medii lichide, se dezvoltă la suprafață formând un

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

miceliu mai subţire sau mai gros, după specia de mucegai şi cantitatea de substanţe nutritive din mediu. În interiorul mediilor de cultură se dezvoltă de obicei microorganismele facultativ anaerobe (drojdiile, care formează de la început un sediment pe fundul vasului). Oxigenul necesar acestor microorganisme difuzează în interiorul mediului prin dizolvare. Producţia microbiană a culturilor aerobe pe medii lichide este influenţată de raportul volum:suprafaţă.

Dezvoltarea microorganismelor aerobe pe medii solide în vasele de laborator menţionate se realizează pe suprafaţa acestora, în condiţiile unui bun contact cu oxigenul. Ca medii de cultură solide se pot folosi medii de cultură lichide solidificate cu diferiţi agenţi (agar, gelatină, pectină, CMC, gel de silice) sau medii solide prin natura lor, boabe de cereale, tărâţe, pâine, rădăcini (morcov), cartofi etc.

Metoda culturilor submerse. Microorganismele se pot dezvolta la fel de bine şi în interiorul mediilor de cultură, ca şi la suprafaţa lor, în condiţiile asigurării oxigenului necesar; acesta este alimentat prin agitare, ceea ce previne asocierea celulelor de drojdii şi bacterii, care rămân izolate.

Metoda vaselor agitate. În vederea obţinerii unei mase miceliale uniforme s-a propus folosirea unui sistem de agitare în timpul procesului de cultivare a microorganismelor care se înmulţesc prin spori. Metoda se aplică la cultivarea în laborator a tuturor microorganismelor aerobe care produc antibiotice, enzime, vitamine. Agitarea vaselor se realizează cu agitatoare care acţionează pe orizontală cu mişcare du-te - vino sau cu sisteme rotative. Acestea din urmă sunt mai eficace şi prezintă avantajul posibilităţii de modificare a turaţiei şi a amplitudinii de agitare.

Metoda culturilor agitate prin barbotare de aer. Bacteriile și drojdiile se pot înmulți submers și prin barbotare de aer prin mediu. Aerul barbotat asigură aerarea și agitarea mediului de cultură.

2.4.2. Procedee pilot

Studiul înmulțirii microorganismelor prin metode de laborator este util pentru stabilirea condițiilor optime de dezvoltare (sursa de carbon, azot, săruri nutritive, factori de creștere, microelemente, pH, temperatură) și a condițiilor optime de producție care se ofera microorganismului. Aceste date se obțin în laborator după un mare număr de experimente și nu se poate trece direct la producția de microorganisme la nivel industrial deoarece condițiile de înmulțire din instalațiile industriale diferă de cele de laborator. Față de factorii care influențează dezvoltarea microorganismelor în laborator prezintă importanță și tensiunea optimă de oxigen din mediu, agitarea (în strânsă legatură cu primul factor) și gradul de spumare a mediului (Popa și colab., 2001). Primii factori afectează durata proceselor metabolice, precum și randamentul în masă microbiană și metaboliți. Aceste elemente determină studierea înmulțirii microorganismelor în instalații pilot, în condiții de lucru foarte apropiate sau identice cu cele industriale.

Pe lângă influența tensiunii de oxigen (microaerobioză, aerobioză la presinue atmosferică, suprapresiune) și a agitării asupra înmulțirii, în instalația pilot se mai stabilește sensibilitatea microorganismelor la infecții. Datele obținute privind înmulțirea și dezvoltarea microorganismelor în instalația pilot permit aplicarea condițiilor optime necesare la nivel industrial.

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Metoda culturilor de suprafaţă. Pentru dezvoltarea microorganismelor după această metodă se folosesc tăvi de diferite dimensiuni construite din aluminiu, oţel inoxidabil, tablă de oţel lăcuită etc. Mediul de cultură poate fi lichid sau solid; el se aşează pe tăvi în strat de grosime convenabilă (1-10 cm). Tăvile se aşează pe rafturi într-un dulap care se poate închide ermetic. Instalaţiile pilot de acest gen se construiesc astfel încât să se poată lucra atât în condiţii de sterilitate, cât şi de semisterilitate, deoarece primele sunt greu de realizat la nivel industrial şi, în acelaşi timp, în asemenea instalaţii nu se pot dezvolta microorganisme sensibile la infecţii (Popa şi colab., 2001).

Sterilizarea instalaţiei se face cu abur, mediul fiind pus pe tăvi, sau fără mediu, cu introducerea ulterioară a mediului sterilizat separat. În acest din urmă caz, sterilizarea tăvilor şi a dulapului se poate face cu antiseptice. Însămânţarea se efectuează prin ştuţuri speciale prin pulverizarea pe mediu a unei suspensii de microorganisme în stare vegetativă sau de spori. Însămânţarea cu spori se poate realiza şi prin pomparea sporilor cu ajutorul unui curent de aer steril: sporii se depun încetul cu încetul pe mediu şi încep să se dezvolte. Dacă mediul de cultură şi microorganismul nu sunt prea sensibile la infecţii, însămânţarea se poate face fără prea mari precauţii de menţinere a sterilităţii.

Aerarea culturii în timpul înmulţirii se realizează cu aer sterilizat şi condiţionat (temperatură şi umiditate) care se suflă încet deasupra tăvilor.

Această metodă se foloseşte la studiul cultivării microorganismelor pe medii solide şi pentru dezvoltarea acestora la suprafaţa mediilor lichide în industriile fermentative (de ex. cultivarea bacteriei *Acetobacter xylinum* pentru obţinerea celulozei bacteriale).

Metode submerse. Pentru înmulţirea submersă a microorganismelor în condiţii pilot se folosesc instalaţii care să semene mult ca mod de funcţionare cu instalaţiile industriale.

Tambure rotative. Dezvoltarea submersă a microorganismelor în tambure rotative are loc prin rostogolirea mediului o dată cu rotirea tamburului. Aceste aparate permit folosirea mediilor lichide şi a mediilor solide mărunţite care nu se aglomerează. Tamburul are forma de cilindru aşezat orizontal şi terminat cu capete semisferice. În interior are sudate de-a lungul generatoarei palete care antrenează mediul în timpul învârtirii şi asigură o bună aerisire. Aerul steril necesar aerisirii se introduce prin ax. Aparatul se sterilizează cu abur şi poate lucra sub presiune. Se foloseşte pentru studiul fermentaţiei oxidative submerse şi pentru cel al producerii enzimelor pe medii solide.

Fermentatoare pilot. Instalaţiile pilot pentru înmulţirea submersă a microorganismelor prin barbotare de aer şi agitare s-au perfecţionat foarte mult în ultimul timp, existând posibilitatea efectuării unor experimente identice cu cele din instalaţiile industriale. Ele au caracter general, putând fi folosite la orice fermentaţie submersă.

Sterilizarea aerului tehnologic necesar în procesele aerobe, constitue una dintre problemele de importanţă majoră în biotehnologii, de rezolvarea căreia depinde buna desfăşurare a procesului de biosinteză.

Pentru sterilizarea aerului se cunosc următoarele metode bazate pe distrugerea microorganismelor:

- sterilizarea termica;
- sterilizarea cu raze ionizate sau ultra-violete;
- sterilizarea cu agenţi chimici;

BCU ASCENTRA UNIVERSITY LIBRARY

- sterilizarea prin filtrare.

La sterilizarea aerului prin utilizarea **procedeului termic**, se cer temperaturi ridicate deoarece microorganismele au rezistență mare la temperaturi uscate. Sporii din aer sunt distruși în 24 secunde la 218-220°C, iar această temperatură poate fi obținută fie prin încălzirea aerului într-un schimbător de căldură, fie prin comprimarea aerului în compresor adiabatic.

Metodele de sterilizare prin utilizarea **radiațiilor catodice, gama, U.V.**, cu lungime de undă cuprinse între 226 și 328 nm și a **agenților chimici**, printre care fenol, etilen-oxid, derivați organo-mercurici, nu au depășit sfera de laborator.

Sterilizarea aerului prin **metoda filtrării**, se realizează pe filtre mecanice prevăzute cu un strat de material fibros. La început s-au folosit fibre din bumbac dar, odată cu dezvoltarea producției industriale de antibiotice, fibrele de bumbac au fost înlocuite cu fibre de sticlă.

În prezent, cea mai largă utilizare în procesele biotehnologice o are **procesul de sterilizare a aerului bazat pe principiul filtrării combinat cu efectul termic.**

După acest procedeu, aerul tehnologic supus procesului de sterilizare trece prin filtru cu saci pentru separarea particulelor solide, apoi este încălzit, în schimbător de căldură sau în compresor, la 150-160°C. Aerul încălzit este trecut în continuare printr-un răcitor de aer, separator de picături, filtru principal cu material fibros (prima treaptă de purificare), filtru individual cu material fibros (treapta a doua de purificare) după care pătrunde în fermentator. Schema de principiu a liniei de purificare și sterilizare a aerului tehnologic este redată în figura 14.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

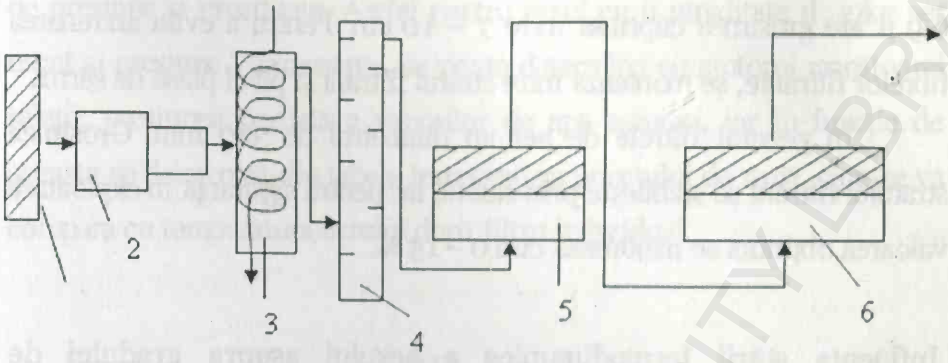


Fig. 14. Procedeu pentru sterilizarea aerului tehnologic
1 - filtru cu saci; 2 - compresor (sau preîncălzitor); 3 - răcitor; 4 - separator de picături; 5 - filtru principal; 6 - filtru îndividual.

La încălzirea aerului prin comprimare adiabatică creşterea temperaturii se determină cu ecuaţia:

$$T_2 = T_1 \cdot \left(\frac{P_2}{P_1} \right)^{\frac{k-1}{k}}$$

în care: T_1 = t° iniţială a aerului în °K;

T_2 = t° finală a aerului în °K;

$K = c_p / c_v$ coeficient adiabatic al aerului.

Dacă încălzirea aerului se face în schimbător de căldură tip ţeavă în ţeavă, temperatura finală se determină din bilanţul termic.

Filtrul de aer este format dintr-un strat de material filtrant plasat între două plăci perforate. Stratul de material filtrant, din fibra de sticlă cu Φ =

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

6-9 μ are grosimea cuprinsă între 7 – 10 cm. Pentru a evita antrenarea fibrelor filtrante, se montează între stratul filtrant şi plăci plasă de sârmă.

În general filtrele de aer au diametrul de 360 mm. Grosimea stratului filtrant se stabileşte prin calcul, iar pentru siguranţă în exploatare valoarea obţinută se majorează cu 10 – 15 %.

Influenţa stării termodinamice a aerului asupra gradului de sterilizare. Materialul filtrant asigură gradul de sterilizare dorit numai dacă se evită umezirea acestuia prin pătrunderea umidităţii din aer sau a uleiului din compresor. Sub acest aspect este necesar a se determina corect condiţiile climatice iniţiale - **presiunea, umiditatea relativă, temperatura medie** - iar în funcţie de acestea să se stabilească regimul de exploatare al instalaţiilor de sterilizare a aerului. Pentru a nu favoriza pătrunderea umidităţii în filtrul principal şi în cel individual aerul comprimat se răceşte sub valoarea temperaturii punctului de rouă, se îndepărtează umiditatea separată şi se încălzeşte pentru a depăşi temperatura critică. Acest procedeu, de răcire a aerului şi îndepărtare parţială a umidităţii este utilizat în **perioada de vară** cînd aerul are temperatură şi umiditate relativ mare.

Dacă aerul are un conţinut scăzut în umiditate, cum este în **perioada de iarnă**, răcirea se face până la o temperatură superioară punctului de rouă, după care se trece prin cele două filtre.

În industria de biosinteză, presiunea aerului la ieşirea din compresor este cuprinsă între **1,5 - 2,5 at.**, iar după filtrul individual între **1-2 at.** Deoarece scăderea presiunii aerului determină scăderea temperaturii punctului de rouă, valoarea acestuia se va stabili în funcţie

BCU ASPENTRA UNIVERSITY LIBRARY

de presiune şi umeditate. Astfel pentru aerul cu o umiditate d g/kg aer uscat şi presiune P cunoscute, se poate determina cu ajutorul următoarei relaţii, presiunea parţială a vaporilor de apă saturaţi, iar în funcţie de aceasta se determină din tabele temperatura punctului de rouă, care se va compara cu temperatura aerului după filtru individual.

$$p = \frac{p}{\varphi}\left(\frac{622}{d} + 1\right)$$

Parametrii principali ai procesului de sterializare a aerului sunt: temperatura punctului de rouă a aerului comprimat, temperatura aerului după filtrul individual şi temperatura aerului după destinderea adiabatică la ieşirea din barbotor. Valorile acestor parametri se pot stabili cu diagrame ce dau dependenţa dintre conţinutul de umiditate şi temperatura punctului de rouă precum şi dependenţa dintre temperatura aerului după scăderea presiunii şi temperatura iniţială.

2.4.3. Procedee industriale

Elementele principale ale instalaţiilor industriale utilizate în procese biotehnologice sunt vasele de fermentaţie numite şi fermentatoare (figura 15). De obicei, înmulţirea microorganismelor se face în mai multe etape cu un raport de însămânţare de 10%. Pentru aceasta se construiesc grupuri de fermentatoare formate din două sau trei vase cu capacităţi de 50, 500 şi 5000 L.

BCU "ASCENTRAL" UNIVERSITY LIBRARY

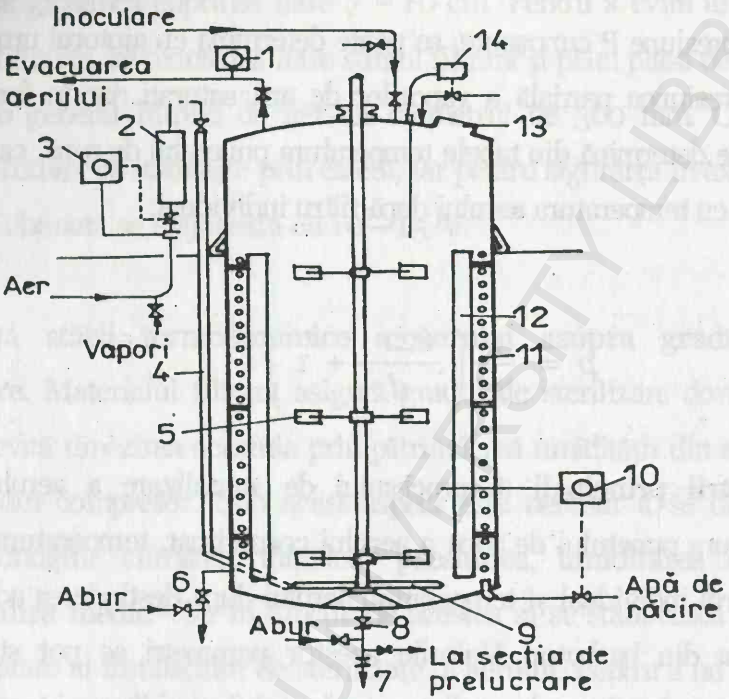


Fig. 15. Fermentator pentru dezvoltarea microorganismelor în culturi submerse (după Popa şi colab, 2001); 1-aparat de înregistrat presiunea; 2-filtru de aer; 3- debitmetru de aer; 4- conductă de aer; 5- agitator; 6-robinet de luat probe; 7-evacuare la canal; 8-robinet de evacuare; 9-barbotor; 10-termometru; 11-serpentină; 12-şicane; 13-gura de vizitare; 14-dispozitiv pentru spargerea spumei.

Fermentatoarele sunt prevăzute cu instalaţii de insuflare a aerului şi agitare, cu posibilitatea modificării atât a sistemului de aerare, cât şi a turaţiei agitatorului. Sterilizarea mediului se face în fermentatoare prin manta cu vapori indirecţi sau chiar cu vapori direcţi prin barbotare în mediu. Răcirea şi termostatarea se efectuează prin manta, prin circulaţia apei de termostatare.

Pentru controlul temperaturii şi al debitului de aer există aparate de înregistrare a acestor parametri. Aerul este furnizat de compresoare cu piston sau turbosuflante de capacităţi corespunzătoare. Sterilizarea aerului se face prin filtre generale cu cărbune, vată de sticlă sau chiar vată de bumbac montate pe coloana de aer, apoi prin filtrele individuale ale fiecărui fermentator.

Adăugarea de precursori, substanţe nutritive sau antispumanţi se realizează din vase speciale care permit introducerea lor în condiţii sterile (fig. 16). Însămânţarea dintr-un vas în altul se efectuează în condiţii sterile prin conducte de legătură cu ajutorul aerului comprimat steril. Instalaţiile moderne sunt prevăzute cu dispozitive de înregistrare şi reglare automată a pH-ului, rH-ului, precum şi de monitorizare asistată de calculator.

Înmulţirea microorganismelor în instalaţii industriale se poate realiza **periodic** sau **continuu.** Când se lucrează periodic se pot urma două căi: microorganismul se înmulţeşte în întreaga masă de mediu introdusă în fermentator integral de la început, fie se realizează înmulţirea pe o cantitate mică de mediu cu alimentarea continuă pe parcurs, până la umplerea fermentatorului. **Viteza de alimentare** poate fi constantă sau logaritmică; în acest din urmă caz se ţine cont de nevoile crescânde în substanţe nutritive ale masei microbiene care se multiplică în condiţii favorabile de mediu după o lege exponenţială. Este evidentă intensificarea aerării odată cu creşterea masei microbiene. La înmulţirea continuă a microorganismelor, viteza de alimentare cu mediu este constantă, de asemenea şi viteza de evacuare a mediului pentru separarea masei de microorganisme.

Înmulţirea cu alimentare continuă de mediu se aplică în industria drojdiei de panificaţie şi drojdiei furajere.

Pentru primele stadii de înmulţire se folosesc utilaje cu capacitate de laborator şi pilot.

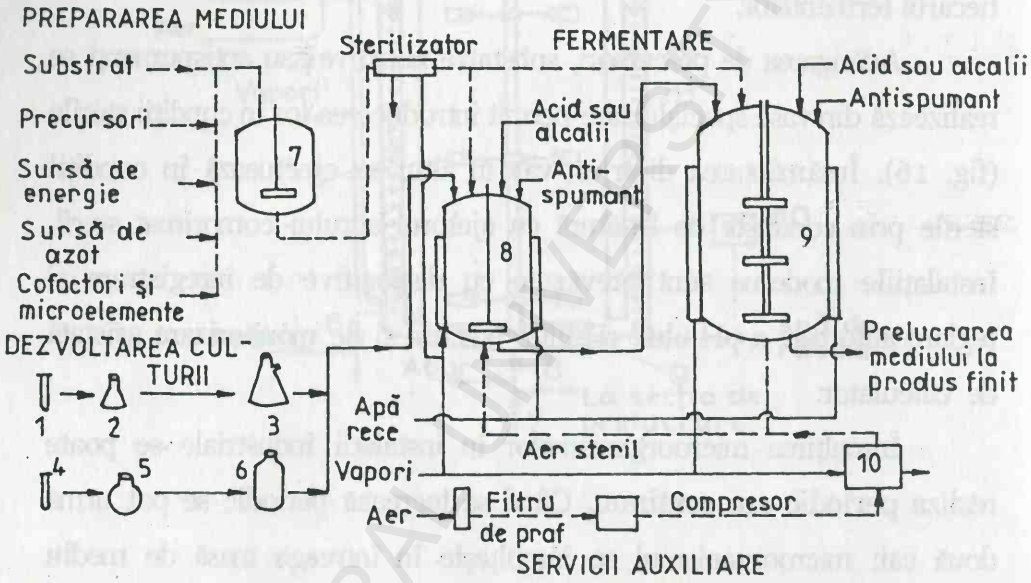


Fig.16. Schema tehnologica pentru dezvoltarea microorganismelor.

1- cultura stoc;
2- creştere în vase conice;
3- vas de transfer;
4- cultura stoc;
5- cultura de spori sau suspensie de spori;
6- vas de transfer;
7- vas pentru prepararea inoculului;
8- vas pentru prepararea mediului de cultură;
9- bioreactor.

CAPITOLUL III
Producerea de energie cu ajutorul microorganismelor. Biocombustibili

Noțiunea de „biocombustibil" este, pentru mulți, relativ necunoscută. În formă lichidă, cum sunt etanolul sau biodiesel-ul, în formă gazoasă, cum este biogazul sau hidrogenul, sau în formă solidă, biomasa, biocombustibilii sunt combustibili utilizați pentru generare de energie sau pentru transport, derivați din surse naturale biologice precum:

• Cereale, trestie de zahăr sau alte surse naturale de amidon care, relativ ușor, pot fi supuse procesului de fermentație alcoolică pentru a se obține etanol. Acesta poate fi folosit drept combustibil pentru motoare cu ardere internă, ca atare sau în amestec cu benzina.

• Materialele celulozice, inclusiv plante ierboase, lemn și diferite deșeuri vegetale rezultate după recoltare sau din procesarea lemnului, precum și unele deșeuri municipale solide pot fi de asemenea transformate în alcool. Celuloza poate suferi însă și un proces de gazificare pentru a obține hidrogen sau pentru producerea gazului de sinteză, care este în continuare transformat în diferite forme de combustibil lichid, cum este dimetil eter (DME) sau chiar benzină și motorină sintetică.

• Uleiurile extrase din culturile de oleaginoase (rapiță, soia, floarea soarelui, etc.) pot fi convertite într-un amestec de metil esteri cu

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

denumirea convenţională de biodiesel, care este un combustibil lichid ce poate fi utilizat în amestec cu motorină sau ca biodiesel pur.

• Deşeurile organice pot fi de asemenea convertite în diferite forme de combustibil ca de exemplu uleiuri reziduale → în biodiesel; dejecţii animale şi resturi menajere organice → în biogaz; deşeuri vegetale din agricultură şi silvicultură → în etanol (International Energy Agency, 2004).

O reprezentare schematică a tuturor materiilor prime dar şi a proceselor de transformare care stau la baza obţinerii de biocombustibili poate fi vizualizată în fig. 17.

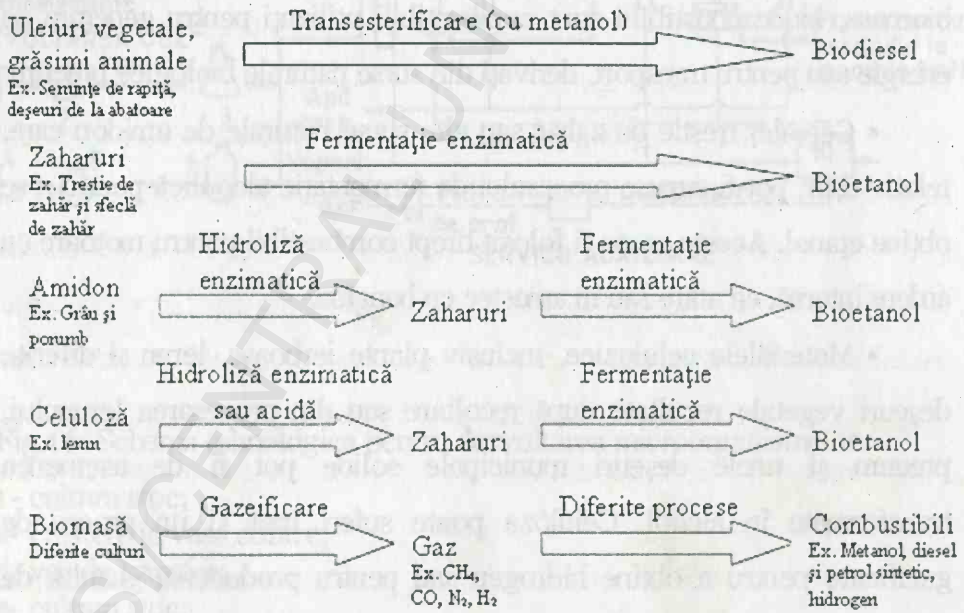


Fig. 17 Materii prime şi procese de transformare pentru producerea de biocombustibili

Chiar înainte de al doilea război mondial, ţări ca Germania de exemplu, priveau biocombustibilii ca alternative la utilizarea petrolului.

În această țară se comercializa un amestec de benzină cu alcool etilic obținut din fermentația cartofului, numit *Reichskraftsprit*. În Marea Britanie, Distillers Company Limited comercializa sub numele de *Discol* un amestec de alcoolul etilic obținut din cereale cu benzină.

După al-II-lea război mondial, petrolul ieftin extras din Orientul Mijlociu a scăzut interesul pentru biocombustibili. Dar șocul petrolului din 1973 și 1979 a readus în atenția instituțiilor guvernamentale și academice problematica biocombustibililor. Începând cu anul 2000, creșterea accentuată a prețului petrolului, diminuarea rezervelor naturale de combustibili, precum și instabilitatea din Orientul Mijlociu au adus în prim plan combustibilii alternativi de tip bio. Statelor Unite de exemplu, au anunțat în 2006 că își propun ca până în 2025, 75% din importurile de petrol din Orientul Mijlociu să fie înlocuite cu biocombustibili.

Noua situație a determinat inițierea unor cercetări în vederea lărgirii surselor și rezervelor energetice, pentru dezvoltarea unor tehnologii menite să exploateze competitiv noi forme de energie și alte materii prime decât cele fosile. Se acordă atenție mai ales unor energii neconvenționale: hidraulică, solară, eoliană, a valurilor, utilizarea hidrogenului, precum și a biomasei vegetale și folosirea deșeurilor urbane și menajere. Formele noi adiționale de energie pot avea un aport însemnat în bilanțul energetic și economic.

În doar câțiva ani limbajul s-a îmbogățit prin reactivarea sau crearea de noi termeni sau noțiuni: "biotransformare", sau "bioconversie", "biomasă energetică", "agrienergie", "energie verde" sau "petrol verde", "petrol accelerat", "biotehnologie", "plante energetice", "plante petrolifere", "plante alcoligene".

BCU IASI CENTRALA UNIVERSITY LIBRARY

Disponibilitatea resurselor energetice este vitală pentru dezvoltarea și promovarea unor tehnologii care să asigure creșteri economice semnificative. În acest context se impune găsirea unei soluții pentru depășirea cercului vicios: lipsa resurselor financiare pentru energie duce la dezvoltarea limitată, constrânsă a tehnologiilor, iar lipsa unor tehnologii moderne duce la imposibilitatea acumulării unor resurse financiare. Tendința, semnalată din ce în ce mai frecvent în țările dezvoltate, de a găsi surse alternative de energie poate fi o cale de depășire a acestui paradox.

După forma de agregare biocombustibilii pot fi clasificați:

- *Biocombustibilii lichizi* (de obicei bioalcooli) precum etanol; biodiesel; uleiuri vegetale;
- *Biomasa solidă* este folosită în mod direct de obicei, sub formă de solide combustibile.
- *Biogazul.*

Avantajele utilizării biocombustibililor

Biocombustibilii au un rol unic în politica energetică europeană. Acest tip de combustibili sunt, astăzi, singurii substituenți direcți ai petrolului pentru activități de transport care sunt disponibili pe o scară semnificativă (Biofuels Research Advisory Council, 2006).

Schimbarea amestecului combustibil pentru activități de transport în Uniunea Europeană este un obiectiv important deoarece sistemul actual de transport este aproape în totalitate dependent de petrol. Majoritatea cantităților de petrol necesare sunt importate de către țările europene, în general din regiuni ale lumii instabile din punct de vedere

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

politic. Din acest motiv petrolul este sursa de energie care pune la grea încercare securitatea aprovizionării Europei.

Biocombustibilii au un al doilea mare avantaj: faptul că producerea și folosirea lor duc la diminuarea emisiilor de gazelor ce sunt direct răspunzătoare de efectul de seră. Fără a fi cea mai ieftină metodă de diminuare a emisiilor de gaze, folosirea biocombustibililor este una dintre puținele metode – pe lângă îmbunătățirea eficienței consumului de combustibil – care oferă perspective practice de diminuarea a emisiilor, la scară mare, în sectorul de transport pe termen mediu. Diminuarea emisiilor de gaze devine stringentă deoarece se estimează că emisiile anuale din sectorul transportului vor crește cu 77 milioane de tone în intervalul 2005 – 2020, adică de trei ori mai mult decât în orice alt sector economic (figura 18).

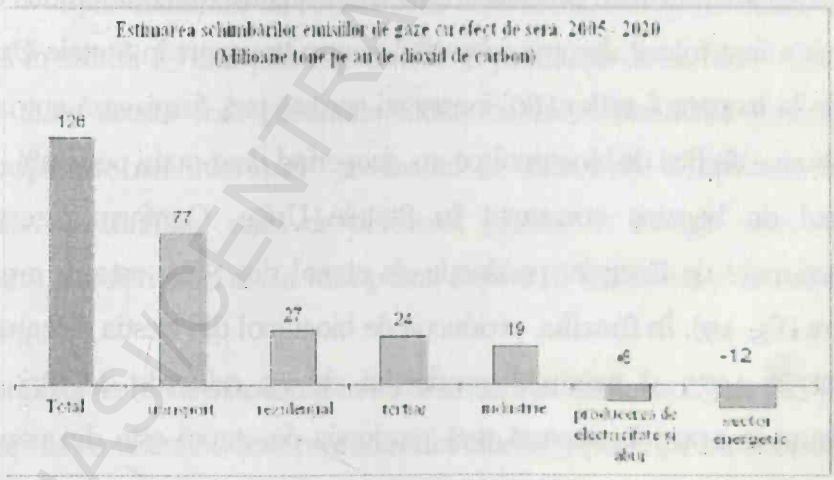


Fig. 18. Estimarea evoluției cantității de gaze cu efect de seră 2005 – 2020 (Comisia Comunității Europene, 10.1.2007)

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Astfel, promovarea biocombustibililor oferă beneficii pentru siguranța aprovizionării şi pentru politicile de mediu. Totuşi este important de notat faptul că, producerea de biocombustibili se realizează prin tehnologii care nu întotdeauna diminuează emisiile de gaze cu efect de seră sau care pot produce efecte negative asupra mediului – de exemplu, prin transformarea mediilor naturale cu biodiversitate ridicată în terenuri folosite pentru culturi tehnice. Pentru a fi eficiente, politicile şi strategiile care promovează obținerea pe scară largă a biocombustibililor trebuie să asigure că biodiversitatea arealelor va fi respectată.

Consumul şi producția globală

În întreaga lume, etanolul este de departe cel mai folosit biocombustibil pentru activitățile de transport, şi aceasta în mare parte datorită cantităților mari produse în SUA şi Brazilia. Etanolul produs din porumb a fost folosit drept combustibil pentru transport în Statele Unite încă de la începutul anilor '80, iar astăzi această țară furnizează aproape 10 milioane de litri de bioetanol pe an, acoperind doar puțin peste 2% din volumul de benzină consumat în Statele Unite. Conform Agenției Internaționale de Energie, producția de etanol din SUA este în rapidă creştere (fig. 19). În Brazilia, producția de bioetanol din trestia de zahăr a început în 1975 şi maximul producției de 15 miliarde de litri s-a înregistrat în 1997. In această țară producția de etanol este din nou în creştere începând cu anul 2003 fiind în continuare mai mare decât producția din Statele Unite. Întreaga cantitate de benzina comercializată în Brazilia conține între 22 – 26% etanol.

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

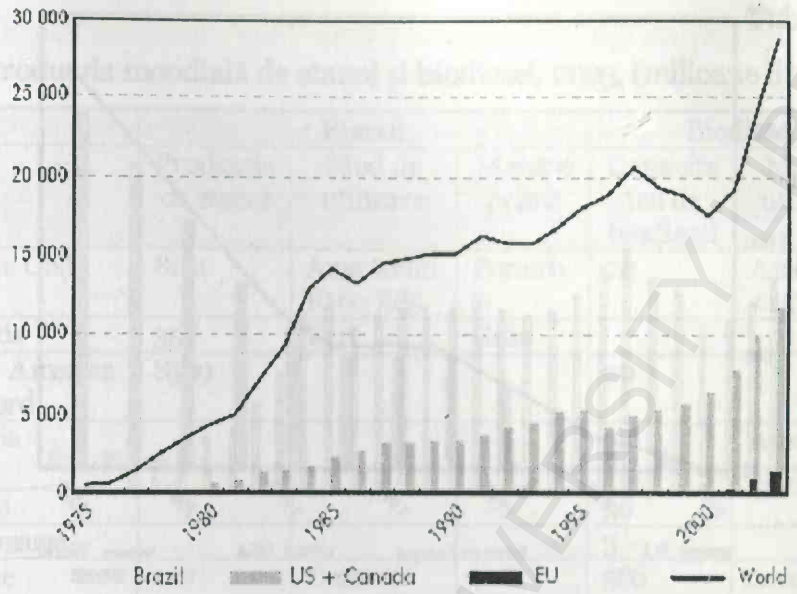


Fig. 19. Producția de etanol pe regiuni și în lume, 1975 – 2003 [milioane de litri]

Spre deosebire de continentele americane, Europa se remarcă mai ales în ultimii 15 ani, prin capacitățile și producția de biodiesel (fig. 20). Cu toate acesta însă producția totală de biocombustibili realizată în Europa este net inferioară producției de etanol din Brazilia și Statele Unite. O cantitate mică de biodiesel produs în Europa este folosită pentru alte activități decât transportul cum ar fi încălzirea și alte aplicații energetice.

Producția de biocombustibili în lume la nivelul anului 2003 pe țări și pe tipuri de combustibil este prezentată în tabelul 5 (Agenția Internațională de Energie, 2004).

BCU "LUCIAN BLAGA" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

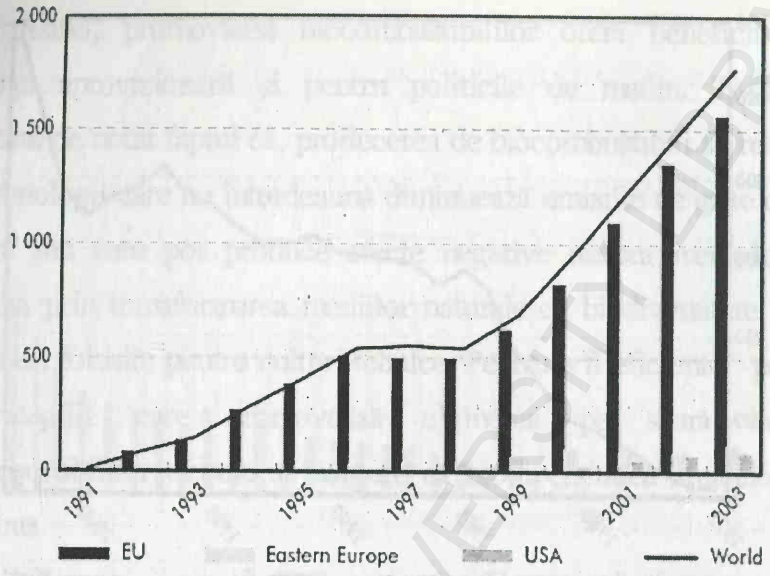


Fig. 20. Capacitatea de biodiesel în lume și pe regiuni, 1991 – 2003, [milioane de litri pe an]

În Europa principalele țări producătoare de biodiesel sunt Franța, Germania și Italia. Acest tip de biocombustibil este folosit în general sub formă de amestec, de obicei în concentrații de 5% sau 20%. Cu toate acestea, în Germania, biodiesel-ul este în mod obișnuit comercializat în concentrație de 100%. Unii producători europeni de vehicule (VW, BMW) au aprobat folosirea biodiesel-ului pur în anumite motoare, în timp ce alții sunt îngrijorați de problemele de compatibilitate dintre vehicule și combustibil, și de potențiala creștere a emisiilor de NO_x (German Government, 2004).

BCU MIRCEA CEL BĂTRÂN CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 5

Producţia mondială de etanol şi biodiesel, 2003, (milioane litri)

	Etanol			Biodiesel	
	Producţia de etanol	Mod de utilizare	Materie primă	Capacitatea de biodiesel	Mod de utilizare
Statele Unite	8151	Amestecuri E10; E85	Porumb	70	Amestec <25%
Canada	358	E10	Grâu		
AIE* America de Nord	**8509**			**70**	
Austria				32	Amestec <25%
Belgia				36	
Danemarca				3	
France	117	Convertit ETBE**	70% sfeclă 30% grâu	386	Amestec 5%
Germania				625	100% biodiesel
Italia				239	Amestec <25%
Spania	144	Convertit la ETBE	Orz	9	
Suedia	44	E10, E85, E95	Grâu	17	Amestec <25%
Marea Britanie				6	
Alte state europene	85				
Europa	**390**			**1353**	
Polonia	48	Amestecuri		80	
AIE Europa	**438**			**1433**	
AIE Pacific (doar Australia)	40	E10, E20		Grâu, trestie	
America Latină (doar Brazilia)	12620	E26, E95			
Asia (doar China	289	Amestecuri			
Lume	**21841**			**1503**	

** etil-ter-butil-eter

BUCHAREST UNIVERSITY LIBRARY

3.1. Obţinerea de biocombustibili din biomasa vegetală prin procese de extracţie şi separare

3.1.1. Rezerve de biomasă vegetală accesibile

Posibilităţile de generare a energiei şi produselor chimice din biomasa vegetală au orientat preocupările ştiinţifice în direcţia valorificării complexe a deşeurilor de exploatare cât şi a culturilor energetice. Este din ce în ce mai evidentă opţiunea bioenergetică a mediilor ştiinţifice a căror preocupări vizează trei direcţii importante de acţiune:

- identificarea **surselor de biomasă vegetală disponibile** sau identificarea unor derivaţi ai acestora;
- identificarea **modului în care această masă trebuie procesată** pentru a obţine combustibili, substanţe chimice cu potenţial industrial valoros, etc.;
- identificarea celor mai adecvate **domenii de utilizare.**

În prezent sunt considerate ca surse de biomasă vegetală următoarele elemente: **lemnul, reziduurile culturilor agricole** (paie), **culturi de plante cu potenţial energetic** deosebit, **reziduuri organice.** Totodată sunt cunoscute câteva posibilităţi de creştere a rezervelor de masă vegetală, care sunt prezentate în fig. 21 (Popa şi Rozmarin, 1994).

Biomasa vegetală, utilizată ca materie prima prezintă **avantajul** unei **regenerări continue în cantităţi mari,** cu un conţinut energetic ridicat. Astfel, se apreciază că plantele terestre asimilează $3,3 \times 10^4$ kg CO_2 / an din care 6 % se regăsesc în celuloză, ceea ce înseamnă la nivel mondial 24 tone celuloza/an/locuitor. Prin urmare, în condiţiile în care se dispune,

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

în mod controlat, de un fond de biomasă vegetală accesibilă valorificării complexe se poate realiza şi o largă varietate de produse competitive cu cele obţinute prin tehnologii clasice (fig. 22).

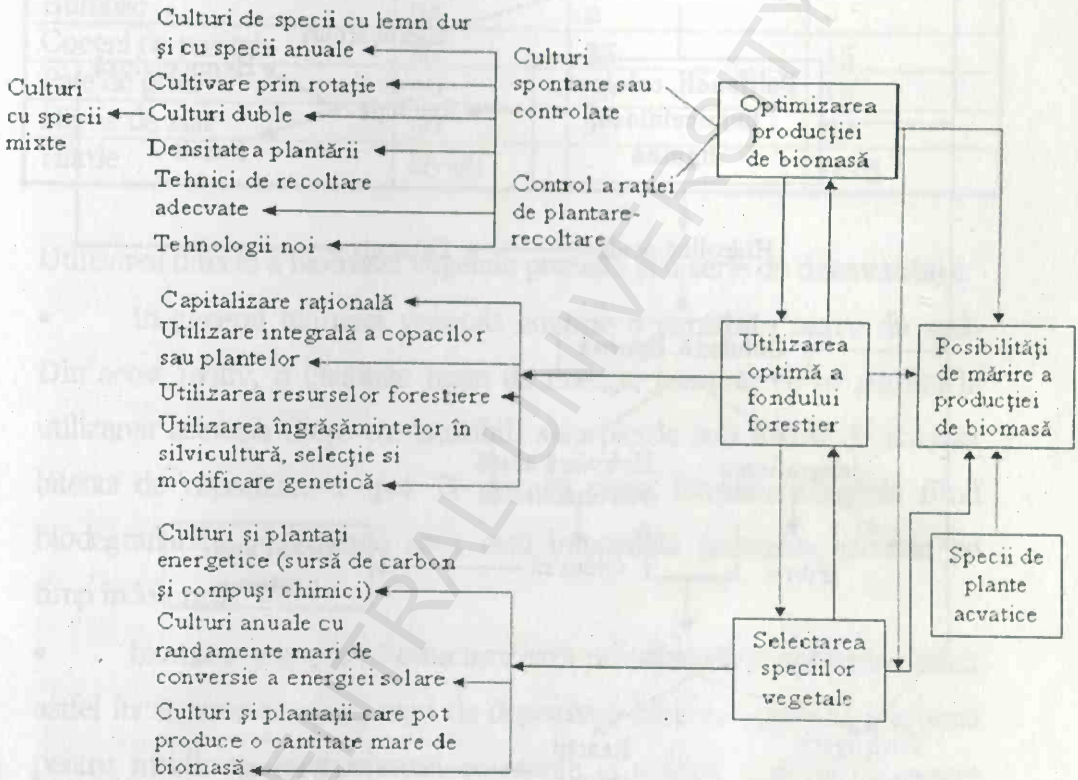


Fig. 21 Surse de biomasă şi posibilităţi de sporire a producţiei de biomasă vegetală

Al doilea avantaj îl constituie faptul că materiile prime de origine vegetală se caracterizează printr-o compoziţie chimică de bază (tab. 6),

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

care pot constitui sursa de carbon şi energie pentru procesele metabolice ale microorganismelor.

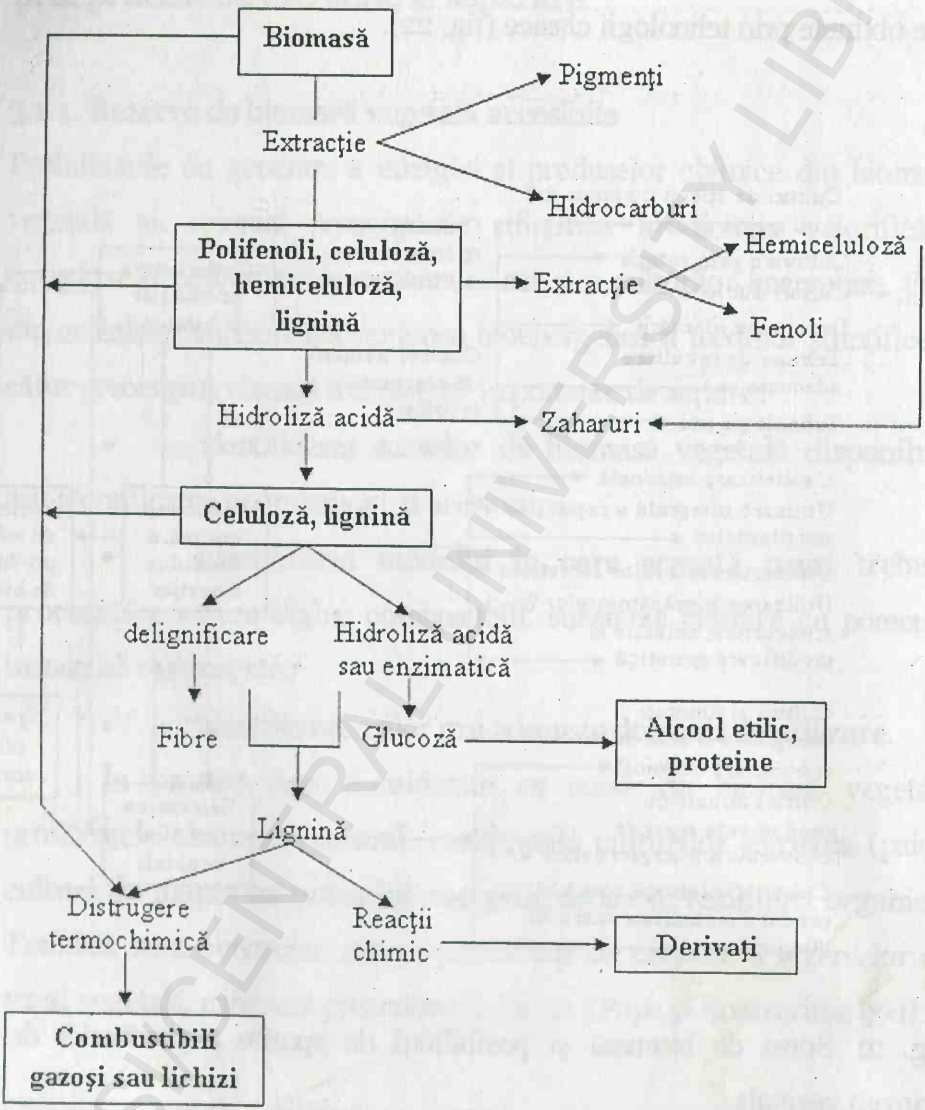


Fig. 22 Procesarea complexă a biomasei vegetale

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 6

Compoziția chimică de bază a unor materiale de origine vegetală

	Component %		
	Celuloza	Hemiceluloze	Lignina
Lemn de conifere	40-50	20-30	25-35
Bumbac	94	2	-
Coceni de porimb	45	35	15
Paie de grau	30	50	15
Hârtie de ziar	50	20	30
Hârtie	85-99	-	0-15

Utilizarea directă a biomasei vegetale prezintă și o serie de **dezavantaje:**

- în general biomasa vegetală conține o **cantitate mare de apă.** Din acest motiv, o cantitate mare de energie termică, ce ar rezulta la utilizarea acesteia drept combustibil, s-ar pierde sub formă de caldură latentă de vaporizare a apei. Pe de altă parte, biomasa vegetală fiind biodegradabilă în prezența apei, este imposibilă păstrarea acesteia pe timp îndelungat.
- biomasa vegetală se caracterizează prin **densitate volumică mică** astfel încât necesită spații mari de depozitare bine echipate cu aparatură pentru menținerea temperaturii constante și a unor condiții de aerare corespunzătoare.

3.1.2. Biocombustibili extrași din biomasa vegetală

Biomasa vegetală poate constitui o sursă de combustibili. In acest sens, sunt cunoscute astăzi câteva direcții de lucru și anume: **obținerea uleiurilor din semințele diferitelor plante, extinderea unor culturi cu conținut energetic ridicat, cultivarea plantelor alcooligene, obținerea**

de hidrocarburi cu ajutorul unor culturi de alge, obținerea de biodiesel.

Obținerea de uleiuri din semințele diferitelor plante - accentul este pus pe obținerea uleiurilor din semințele de in, rapiță, floarea soarelui, arahide, palmier. Aceste uleiuri în afară de utilizările în industria alimentară sau cosmetică, datorită conținutului energetic ridicat, pot fi utilizate fie ca sursă de energie, fie drept combustibil pentru motoarele cu ardere internă.

Floarea-soarelui (43-53% ulei în substanță uscată din sămânță și 58-68% în miez), soia (17-29%), inul de ulei (42-47%), ricinul (47-58%), rapiță, colza (37-49%), sămânță de bumbac (21-30%), arahidele (55%), sintetizează uleiuri pe care le stochează în sămânță. În general aceste specii, cultivate în zonele cu climă temperată (chiar în cazul unor producții duble) nu pot fi considerate foarte rentabile ca plante bioenergetice. Cultivarea în condiții de mediu optime, a unor genotipuri cu capacitate biosintetizantă sporită și un potențial productiv ridicat, poate contribui la utilizarea acestor specii și în zona temperată la producția de carburanți. Din punct de vedere al compoziției însă, uleiul de floarea-soarelui de exemplu, poate fi utilizat cu bune rezultate drept carburant în motoare diesel. Se apreciază că dacă cultivatorii de porumb ar însămânța 1/10 din suprafața totală cultivată cu floarea-soarelui aceștia ar dispune de întreaga cantitate de carburant necesară pentru mașinile agricole pe care le exploatează. Plantele uleioase din zonele cu climat tropical însă, cum este de exemplu, palmierul de ulei, produc 5-6 tone de ulei la hectar; aceasta înseamnă 4,5-5,4 tEP/ha, ceea ce reprezintă o producție rentabilă.

BCU ASIO CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Principalul dezavantaj legat de utilizarea uleiurilor vegetale drept combustibil îl reprezintă vâscozitatea lor ridicată. Acest inconvenient poate fi îndepărtat prin esterificarea uleiurilor, operaţie care duce implicit la creşterea costurilor produselor. În momentul de faţă, în lume, Malaezia este ţara care a dezvoltat şi dezvoltă în continuare o adevărată industrie de obţinere a uleiurilor din seminţe de palmier.

Utilizarea materialelor provenite din culturi cu un conţinut energetic ridicat – Culturi de plante dirijate doar spre producerea energiei reprezintă un obiectiv realizabil şi rentabil când vor fi puse la punct prin cercetări ştiinţifice două cerinţe:

- detectarea unor specii şi crearea genetică a unor varietăţi cu un randament energetic ridicat;
- perfecţionare şi asigurarea tehnicilor de recoltare, transport, depozitare şi transformare a biomasei energetice.

Alături de deşeurile rezultate din exploatarea pădurilor şi din industria lemnului şi alimentară, din activitatea menajeră, din creşterea animalelor şi cultivarea plantelor (tulpini, paie şi alte subproduse agricole), culturile energetice pot furniza o însemnată cantitate de biocombustibili.

Unele plante pot constitui surse pretioase de combustibili direct utilizabili. Asfel, diverse specii pot realiza o bioproducţie de hidrogen, de hidrocarburi şi de uleiuri.

"Plantaţii de petrol". Specii vegetale cum sunt *Euphorbia tiriculli, E. lathyris, E. characias, E. abyssinica,* din familia *Euphorbiaceae,* din care fac parte circa 280 de genuri şi circa 7000 de specii, printre care

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

arborele de cauciuc - *Hevea brasiliensis*, ricinul (pentru ulei) - *Ricinus communis*, tapiocul (pentru amidon) -*Manihot esculenta* sunt înzestrate cu celule (şi vase după dezvoltarea pereţilor celulari) lacticifere în a căror vacuole se acumulează latex. Compoziţia chimică a latexului, care constitue sucul celular, constă dintr-o emulsie în apă a unor molecule de hidrocarburi, de poliisoprene. Aceste molecule, după izolare, pot fi direct utilizabile în rafinăriile de petrol existente unde, printr-un proces de cracare catalitică utilizat la petrolul brut, se poate obţine benzina şi o gamă largă de produse chimice (care sunt materii prime cu mult mai scumpe decât benzina).

Pentru chimizare, "uzinele verzi" cum sunt numite speciile de *Euphorbia*, după recoltare şi uscare, sunt puse în contact cu un solvent chimic, pentru dizolvarea tuturor hidrocarburilor. Reziduurile obţinute în această etapă sunt din nou supuse unei extracţii cu solvenţi pentru a se obţine diverse zaharuri fermentescibile. Reziduul lemnos rezultat în urma acestui ultim proces ar putea fi folosit ca materie prima celulozo-chimică. Prin aplicarea acestor tehnologii, din 1000 tone de substanţă uscată vegetală, ar fi posibilă obţinerea a 80 tone de hidrocarburi şi a 260 tone de zaharuri (care prin fermentaţie alcoolică produc 100 tone de alcool etilic). Chiar după recuperarea solventului mai rămân încă 200 tone de reziduuri tip melasă. Totalul de energie obţinută în acest mod ar fi de peste 9000 milioane BTU ("British Thermal Unit") din 1000 tone s.u.

Avantajul "plantaţiilor de petrol" este enorm dacă se apreciază că plantele euphorbiacee se pot cultiva pe soluri deşertice şi aride. Astfel, suprafeţe întinse din diverse ţări ale lumii, situate mai ales în spaţiul cuprins între Ecuator şi paralelele 30-45 nord şi sud, pot fi amenajate cu plantaţii de *Euphorbia*. Se apreciază că alături de speciile de *Euphorbia* a

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

căror capacitate petroliferă este cunoscută, în flora lumii există sute de specii bogate în compuşi energetici. Urmează ca acestea să fie detectate, studiate, cultivate şi supuse unui program de ameliorare în vederea ridicării randamentului producţiei de hidrocarburi. Pentru ţările Europei, în programele de ameliorare, un obiectiv de prim ordin trebuie să fie obţinerea unor genotipuri adaptate condiţiilor climatului temperat. Specia *Euphorbia characias,* care creşte spontan în zona mediteraneană, poate prezenta un interes aparte, dat fiind faptul ca latexul său poate conţine 25 % cauciuc. Pentru condiţiile României, specia *E. Lathris* poate fi considerată o plantă cu potenţial energetic.

Culturi cu un conţinut energetic ridicat sunt şi cele de *Copaifera* (Brazilia). Copaifera este o plantă leguminoasă care trăieşte în ţinuturi umede atingând 30 m înălţime şi având capacitatea de a îngloba în frunze cantităţi apreciabile de lichid. Acest lichid conţine un amestec de hidrocarburi cu o compoziţie asemănătoare cu a uleiurilor Diesel.

B.C.U. "M. EMINESCU" IAŞI

Producerea de hidrocarburi în culturi de *Botryococcus braunii*

Botryococcus braunii este o specie de **algă unicelulară** în care hidrocarburile constitue 15-75 % din substanţa uscată. Această algă de apă dulce sau sărată, poate fi întâlnită atât în regiunile cu climă temperată cât şi tropicală, unde înmulţirea pe suprafaţa apelor poate fi de-a dreptul spectaculoasă.

Se prezintă sub **două forme** care se deosebesc prin pigmentaţie şi prin structura hidrocarburilor sintetizate:

- **forma verde** – conţine hidrocarburi liniare cu număr impar de atomi de carbon (25 – 31) şi sărace în duble legături.

- **forma roşie** – conţine hidrocarburi cu 32 – 38 atomi de carbon şi bogate în duble legături.

Hidrocarburile se acumulează în peretele celulelor şi sinteza lor este rezultatul activităţii metabolice a algei în faza de creştere. Există posibilitatea extragerii hidrocarburilor prin centrifugare, fără ca celulele să fie distruse.

În legătură cu utilizarea algelor *Botryococcus braunii* mai rămân de elucidat unele probleme şi anume:

- rolul bacteriilor care trăiesc în asociaţie cu alga şi dintre care unele favorizează producerea hidrocarburilor;
- lupta împotriva speciilor concurente şi împotriva paraziţilor;
- controlul factorilor care determină producţia optimă.

În sud-estul Franţei această tehnologie este aplicată într-o unitate pilot de cultură, unde algele sunt cultivate în tuburi din materiale plastice, transparente, conţinând mediu nutritiv şi care au şi rol de captatori de energie solară. Cercetările efectuate la nivel de pilot industrial au condus până la performanţă dublării biomasei de alge în două zile, fapt care măreşte considerabil eficienţa culturii.

Culturi acvatice petrolifere

Zambila de apă, *Eichhornia crassipes,* probabil cea mai prolifică plantă acvatică în zona tropicală, în condiţii climatice şi de nutriţie optime, poate să producă la hectar, pe zi, o tonă de substanţă uscată, circa 300 tone s.u. la un hectar pe an. Aceasta reprezintă echivalentul energetic a 120 tone petrol. În zone tropicale (este originară din America tropicală) zambila de apă este o calamitate. Proliferindu-se rapid blochează staţiile

BCU ASIGENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

de pompare, canalele de irigație, împiedică navigația și favorizează propagarea unor maladii caracteristice. În zonele temperate aceste inconveniente sunt reduse simțitor. În schimb zambila de apă poate realiza creșteri mari pe suprafețe ocupate cu ape inutilizabile. Această plantă are și o capacitate remarcabilă pentru epurarea apelor industriale poluate cu metale periculoase (plumb, cadmiu, nichel sau mercur).

În condiții în care majoritatea țărilor posedă suprafețe acvatice, colonizarea unor suprafețe cu plante acvatice energetice, care nu manifestă cerințe nutritive și nu concurează suprafața ocupată de plantele alimentare sau tehnice, apare ca o sursă foarte valoroasă de biomasă. Valoarea culturilor de plante acvatice (inclusiv de alge) este cu atât mai mare cu cât acestea sunt susceptibile de a valorifica mediile poluate de efluenții urbani sau agro-industriali. Depoluarea este realizată cu succes de către alge în lacurile, sau de către specii precum zambila de apă în bazinele de apă caldă și poluată ale unor industrii sau centrale electrogene. Biomasa sintetizată în aceste ape uzate, reprezintă o sursă însemnată de materie primă pentru obținerea de biogaz (metan) prin procesul de fermentație metanogenă. Astfel, acvacultura bioenergetică este asociată, cu succes, cu procesul depoluării mediului înconjurător.

BCU IAȘI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

3.1.3. Producerea de Biodiesel

Biodiesel este denumirea convențională a unui combustibil de tip mono-alchil ester obținut din surse naturale sau regenerabile bogate în uleiuri vegetale și grăsimi animale. Acest tip de combustibil are caracteristicile principale similare cu cele ale diesel-ului convențional.

Biodiesel-ul nu conține nici un fel de fracții petroliere dar este perfect compatibil cu combustibilul de tip diesel cu care poate fi amestecat în orice proporție pentru a obține un amestec stabil. Acest tip de amestec este ușor caracterizat prin indicația Bxx, în care xx reprezintă procentul de biodiesel în amestec. Exemplu: B10 indică un amestec combustibil format din 10% biodiesel și 90% diesel.

Acest tip de amestec poate fi utilizat în motoarele cu combustie internă fără modificări constructive.

Materii prime - O gamă largă de uleiuri pot fi folosite pentru a produce biodiesel. Acestea pot fi:

- Ulei brut, cele mai des utilizate fiind uleiul de rapiță și soia (uleiul produs din soia reprezintă 90% din materia primă) dar și uleiuri obținute din alte culturi cum ar fi: muștar, in, floarea soarelui, canula (rapiță modificată genetic), ulei de palmier, cânepă; cantități specifice de uleiuri extrase din principalele culturi sunt prezentate în tabelul 7.
- Uleiuri vegetale uzate;
- Grăsimi animale;
- Alge cultivate pe un substrat ce are la bază apă de canalizare (o companie în Noua Zeelandă a dezvoltat cu succes un sistem ce permite folosirea apei de canal drept substrat pentru alge, din care apoi produce biodiesel);

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

• Depolimerizarea este un nou proces important care reduce aproape orice materie primă bazată pe hidrocarburi, incluzând materiile prime care nu sunt pe baza de ulei.

Tabelul 7

Cantităţi specifice de ulei extras funcţie de cultură

Cultură	Kg ulei/ha	Litri ulei/ha	Cultură	Kg ulei/ha	Litri ulei/ha
Porumb	145	172	Susan	585	698
Mahon	148	176	Orez	696	828
Ovăz	183	217	Ulei de tung	790	940
Chenaf	230	273	Floarea soarelui	800	952
Gălbenele	256	305	Cacao	863	1026
Bumbac	273	325	Arahide	890	1059
Cânepă	305	363	Mac	978	1163
Soia	375	446	Seminţe de rapiţă	1000	1190
Cafea	386	459	Măsline	1019	1212
In	402	478	Boabe de ricin	1188	1413
Alune	405	482	Nuci de pecan	1505	1791
Laptele câinelui	440	524	Jojoba	1528	1818
Seminţe de dovleac	449	534	Avocato	2217	2638
Coriandru	450	536	Nucă de cocos	2260	2689
Seminţe de muştar	481	572	Ulei de palmier	5000	5950
			Alge	79832	95 000

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

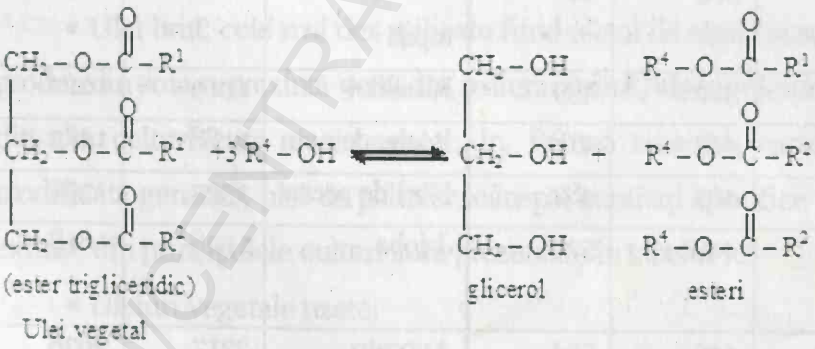
Procesul de transesterificare

Pentru a putea fi utilizate drept combustibil în motoare cu ardere internă uleiurile vegetale trebuie să sufere un proces de transesterificare. Biodiesel-ul, care este de fapt produsul reacției de transesterificare, prezintă următoarele avantaje majore (Demirbas, 2007):

- Este biodegradabil;
- Nu este toxic;
- Nu conține sulf;
- Este produs din surse regenerabile.

Din aceste considerente biodiesel-ul reprezintă o alternativă foarte importantă în strânsă corelație cu principiile de dezvoltare durabilă, conservarea energiei, managementul și protecția mediului.

Transesterificarea este reacția dintre un compus gras (ester trigliceric) cu un alcool prin care se formează esteri și glicerol:



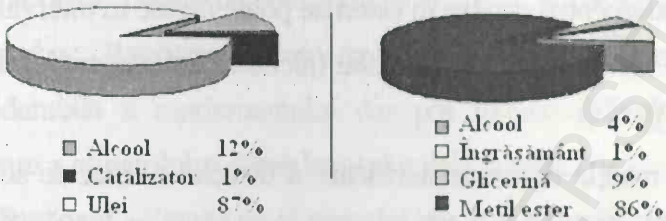
în care R^1, R^2, R^3, R^4 reprezintă diferite grupări alchil.

De obicei pentru îmbunătățirea vitezei de reacției și a randamentului în produs util este utilizat un catalizator de transesterificare de tip alcoolic sau acid (Agarwal și Das, 2001).

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Reacţia este reversibilă şi deci pentru a deplasa echilibrul spre formarea produsului util (esteri) se utilizează un exces de alcool (fig. 23).

Pentru reacţia de transesterificare pot fi utilizaţi alcooli de tipul: metanol, etanol, propanol, butanol, amil alcool (Ma şi Hanna, 1999).



Reactanţi Produşi de reacţie

Fig. 23 Reactanţii şi produşii de reacţie din procesul de transesterificare

Procesul de transesterificare scade considerabil vâscozitatea uleiului vegetal utilizat ca materie primă, astfel încât biodiesel-ul obţinut în urma reacţiei este miscibil cu carburanţii de tip diesel în orice proporţie.

Factori care influenţează procesul de transesterificare

Cele mai importante variabile care influenţează randamentul reacţiei de transesterificare sunt:

- Temperatura de reacţie;
- Raportul molar alcool : substanţe grase;
- Catalizatorul;
- Tipul de reacţie;
- Umiditatea şi prezenţa acizilor graşi liberi (FFA).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Temperatura – reacţia de transesterificare este puternic influenţată de temperatură. Cu toate acestea, în condiţiile în care reacţia se desfăşoară într-un timp îndelungat, transformarea este completă chiar la temperatura camerei. În general însă, reacţia este condusă la o temperatură apropiată de punctul de fierbere al metanolului (60–70°C), la presiunea atmosferică. Randamentul maxim în esteri se poate obţine în intervalul de temperatură 60 – 80°C la un raport molar (alcool:substanţe grase) de 6:1 (Pramanik, 2003).

Studiind reacţia de transesterificare a uleiului rafinat de soia cu metanol (6:1), utilizând drept catalizator soluţie de hidroxid de sodiu 1% la trei temperaturi (60, 45, 32°C) Freedman şi colab. (1984) au demonstrat că după 10 minute de la începerea reacţiei randamentele în esteri au fost de 94%, respectiv 87% şi 64%. După o oră randamentele reacţiei erau identice pentru 60°C şi 45°C şi nesemnificativ mai mici pentru 32°C. Se dovedeşte astfel influenţa importantă a temperaturii asupra randamentului reacţiei de transesterificare dar şi faptul că această reacţie se poate conduce în condiţii foarte bune de transformare la temperatura ambiantă dacă timpul de reacţie este suficient.

Raportul molar - o altă variabilă importantă ce influenţează randamentul reacţiei este raportul molar alcool:ulei vegetal. Stoechiometria reacţiei de transesterificare impune trei moli de alcool pe mol de trigliceridă pentru a obţine trei moli de esteri de acizi graşi şi un mol de glicerol. Pentru a deplasa echilibrul reacţiei de transesterificare spre dreapta este necesară utilizarea unui exces în alcool sau separarea din mediu de reacţie, în mod continuu, a unuia dintre produse.

BCU ASCENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Cea de a doua metodă este mai fezabilă, pe această cale reacția putând fi condusă până la transformarea totală. Și în condițiile în care se utilizează un exces de 100% metanol randamentul reacției poate fi 1.

În practică însă este utilizat în mod frecvent raportul molar de 6:1 pentru a realiza un randament de 98% în cazurile în care se utilizează ca materie primă uleiuri de soia, floarea soarelui, alune sau ulei din semințe de bumbac. Rapoarte molare mai mari de 6:1 nu determină creșterea considerabilă a randamentului dar pot induce dificultăți în etapa de separare a glicerolului (Freedman și colab., 1984).

Catalizatorul -Catalizatorii reacției de transesterificare pot fi de trei feluri: acizi, alcalini și enzime.

Catalizatorii de tip **alcalii** influențează cel mai bine viteza reacției de transesterificare. Datorită acestui fapt dar și acțiunii mai puțin corozive asupra echipamentelor, acest tip de catalizator este cu precădere utilizat în procese industriale. În această categorie de catalizatori pot fi incluși: NaOH, KOH, carbonați precum și alți oxizi de sodiu și potasiu, cum sunt metoxid de sodiu, etoxid de sodiu, propoxid și butoxid de sodiu. Dintre acești compuși alcoxizii de sodiu sunt cei mai utilizați catalizatori datorită costurilor scăzute, concentrațiilor mici (0,5 – 1%) care se adaugă în amestecul de reacție și randamentelor de transesterificare de 94 – 99%.

Catalizatori **acizi** utilizați în reacțiile de transesterificare sunt: acid sulfuric, acid sulfhidric și acid hipocloric.

Din categoria **biocatalizatorilor** pot fi utilizate enzime din clasa lipaze.

Timpul de reacție - Randamentul de transformare crește cu timpul de reacție. În cazul transesterificării unor uleiuri obținute din semințe de bumbac, floarea soarelui și soia realizate la raport molar metanol:ulei de

BCU IASI CENTRALA UNIVERSITARA LIBRARY

6:1, utilizând drept catalizator metoxid de sodiu 0,5% la 60°C, s-a constatat că după 1 minut randamentul reacţiilor (pentru ulei de floarea soarelui şi soia) a fost de aproximativ 80%. După o oră, pentru toate cele trei tipuri de uleiuri studiate conversia atingea randamente de 93 – 98% (Freedman şi colab., 1994).

Umiditatea şi acizii graşi liberi - Într-un proces de transesterificare condus cu un catalizator alcalin materia primă (tigliceride) dar şi alcoolul trebuie să fie anhidre pentru că urmele de apă esenţial prezente induc o reacţie de saponificare. În acest caz randamentul în etil sau metil esteri este scăzut şi mai mult decât atât apar dificultăţi în etapa de separare a produşilor finali. Există însă un prag de umiditate (>1%) pentru care reacţia de saponificare are loc paralel cu cea de transesterificare dar cantitatea de săpunuri astfel formate nu reprezintă o problemă majoră (Schuchardta şi alţii, 1998).

Schema tehnolgică a procesului de obţinere a biodiesel-ului

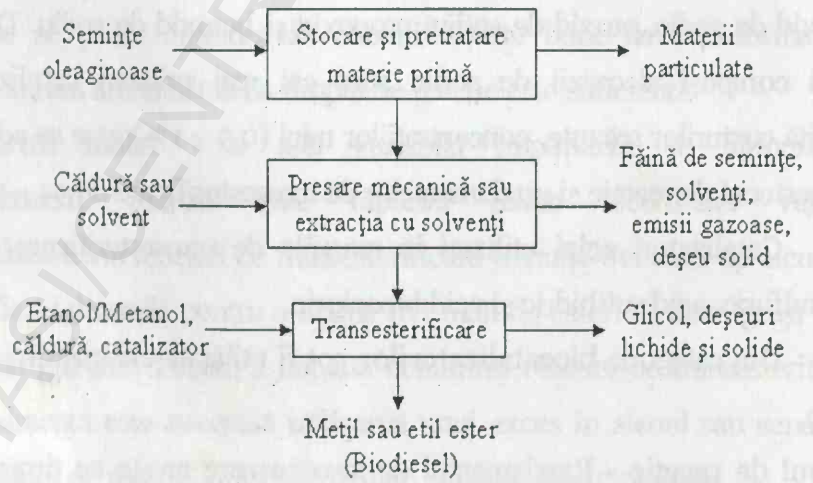


Fig. 24. Schema procesului de obţinere a biodiesel-ului

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

3.2. Obținerea de biocombustibili din biomasa vegetală prin procese fermentative

3.2.1. Producerea de etanol

Modalități și condiții de producere

Sinteza chimică a etanolului se face pornind de la etilenă (provenind din petrol sau gaz metan), care este convertită la temperatură înaltă în prezența apei și a catalizatorilor.

Etanolul se poate produce și din orice materie prima de natură biologică care conține cantități importante de zaharuri sau alți derivați care pot fi convertiți în zaharuri, cum ar fi amidonul sau celuloza. Sfecla de zahăr și trestia de zahăr sunt exemple evidente de materii prime naturale ce conțin zaharuri. Porumbul, grâul și alte cereale conțin amidon (în boabe), compus care poate fi ușor convertit în zaharuri simple. În mod similar, lemnul și plantele sunt în mare parte compuse din celuloză și hemiceluloză care pot fi de asemenea convertite în zaharuri simple, deși cu mai multă dificultate decât la conversia amidonului.

La începutul secolului XX, etanolul era produs pe scară largă prin fermentație alcoolică pentru ca în cursul anilor '70, 70% din etanolul produs, de exemplu în Statele Unite, să fie rezultatul sintezei chimice, deoarece prețurile plantelor zaharoase și a amidonului erau mult prea ridicate. Creșterea continuă și accentuată a prețurilor produselor petroliere însă redă șansele fermantației alcoolice (Hansen, 2005).

Bioetanolul este în general produs prin fermentația zaharurilor sub acțiunea enzimele produse de către levuri. Procesele de fermentație tradițională se bazează pe tulpini de drojdii care convertesc zaharurile cu

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

şase atomi de carbon (în mare parte glucoza) în etanol. Microorganismele şi enzimele utilizate pentru conversia amidonului şi fermentaţia glucozei la scară industrială sunt astăzi relativ uşor disponibile.

Amidonul, zaharoza şi inulina sunt glucide uşor fermentescibile, după reacţia:

$$C_2H_{12}O_6 \longrightarrow 2CH_3CH_2OH + CO_2$$

(Glucoza) ⟶ (etanol) + (gaz carbonic)

Fermentaţia alcoolică anaerobă este realizată de levurile de tipul *Saccharomyces (cerevisiae, oviformis, ellipsoideus, etc.)* care convertesc hexozele sau glucidele de rezervă (glucoza, fructoza), în etanol.

Printre plantele alcooligene intrate în exploatare, sau care pot fi cultivate în scopul producerii de etanol, se numără maniocul, cerealele (mai ales porumbul), cartoful şi napul ale căror glucide de rezervă sunt amidonul şi inulina (numai în cazul napilor) precum şi trestia de zahăr, ananasul, sfecla de zahăr şi sorgul zaharat, la care zaharoza este carbohidratul principal.

Trestia şi sfecla de zahar, porumbul, cartoful, sorgul, grâul, viţa de vie, pot fi numite plante *alcooligene.* Acestea sunt înzestrate cu unele organe (tulpini, rădăcini, boabe, frunze) a căror celule depozitează însemnate cantităţi de glucide uşor hidrolizabile, care, prin fementaţie alcoolică, sunt transformate în etanol. Principalii paşi în procesul de conversie al materiilor prime în etanol, după tipul materiei prime, sunt prezentaţi în figura 25.

BCU ASIGENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

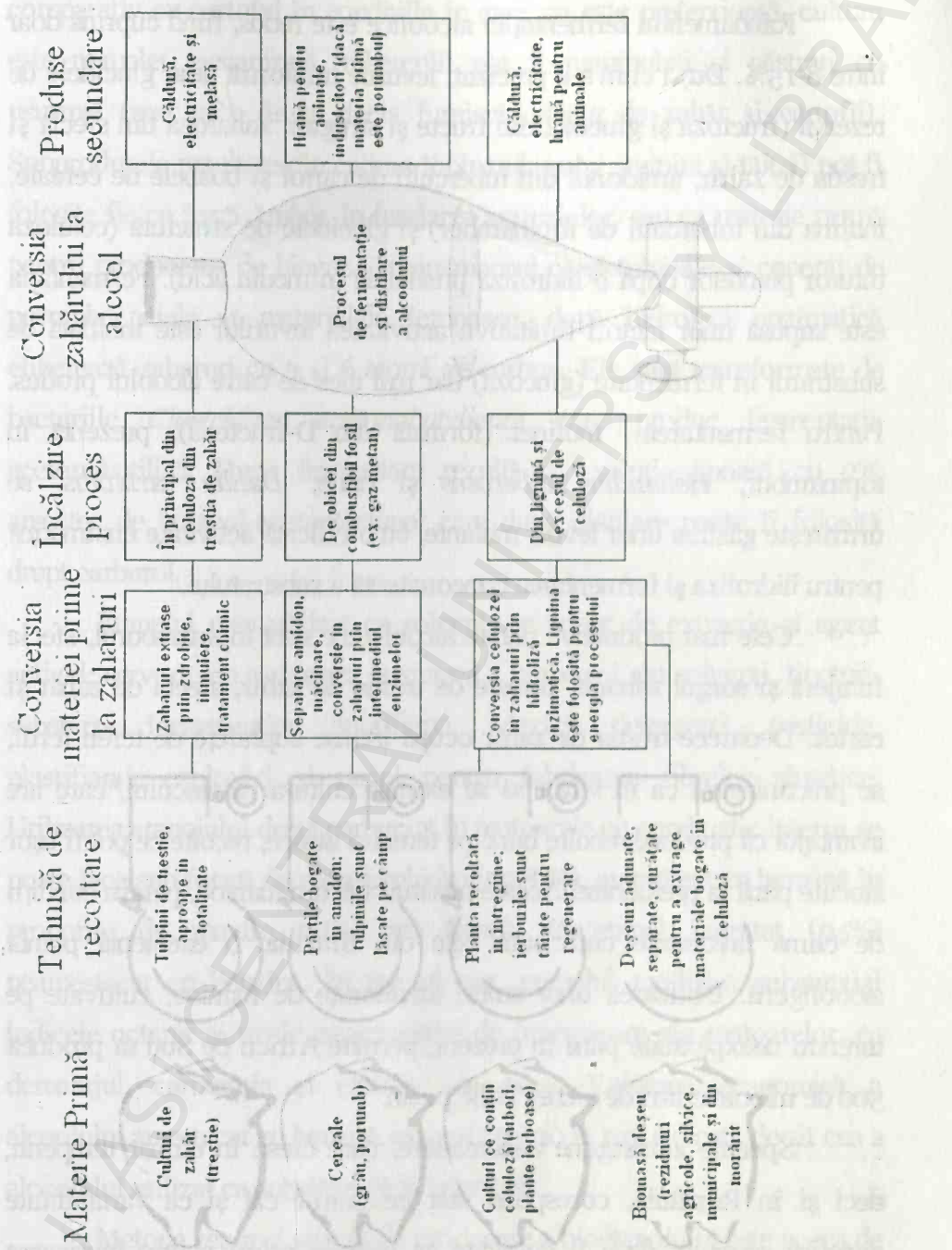


Fig. 25 Etapele obținerii etanolului în funcție de materia primă și de tehnicile de conversie

Randamentul fermentaţiei alcoolice este redus, fiind cuprins doar între 8-15%. După cum s-a precizat, levurile tranformă doar glucidele de rezervă (fructoza şi glucoza din fructe şi struguri, zaharoza din sfeclă şi trestia de zahăr, amidonul din tuberculii de cartof şi boabele de cereale, inulina din tuberculii de topinambur) şi glucidele de structură (celuloza tuturor plantelor după o hidroliză prealabilă în mediu acid). Fermentaţia este supusă unor factori limitativi: activitatea levurilor este inhibată de substratul în fermentare (glucoză) dar mai ales de către alcoolul produs. Pentru fermentarea inulinei (formată din D-fructoza), prezentă în topinambur, *Helianthus tuberosus* şi dalie, *Dahlia variabilis*, se urmăreşte găsirea unor levuri mutante, cu o ridicată activitate enzimatică pentru hidroliza şi fermentarea concomitentă a substratului.

Cele mai productive plante alcooligene sunt topinamburul, sfecla furajeră şi sorgul zaharat, urmate de trestia de zahăr, sfecla de zahăr şi cartof. Deoarece trestia de zahăr ocupă întinse suprafeţe de teren fertil, se preconizează ca în viitor să se extindă cultura manioculuí, care are avantajul că produce recolte bune pe terenuri sărace, recolte ce pot fi uşor stocate până la prelucrare. Aceste trăsături fac din manioc, pentru condiţii de climă favorabile cum sunt cele din Brazilia, o excelentă plantă alcooligenă. Utilizarea unor soiuri ameliorate de manioc, cultivate pe terenuri neexploatate până în prezent, permite Africii de Sud să producă 500 de milioane litri de alcool etilic pe an.

Speciile zaharigene necerealiere, care cresc în climat temperat, deci şi în România, corespund atât ca număr cât şi ca variabilitate genetică scopului de a fi cultivate ca materie primă pentru fabricarea bioetanolului. Printre acestea în afară de viţa de vie, primul loc îl ocupa topinamburul. Planta poate realiza producţii duble de bioetanol

comparativ cu cartoful în condiţiile în care nu este pretenţioasă, cultura este complet mecanizată, tuberculii pot fi manipulaţi şi păstraţi cu usurinţă (mai uşor decât sfecla furajeră, sfecla de zahăr şi cartofii). Subprodusele rezultate din cultura topinamburului (tulpini şi tăiţei) pot fi folosite fie ca îngrăşământ, în furajarea animalelor, sau ca materie primă pentru producerea de biogaz. Topinamburul ca şi tulpinile şi cocenii de porumb, paiele şi materialele lemnoase, după hidroliza enzimatică eliberează zaharuri cu 5 şi 6 atomi de carbon. Ele sunt transformate de bacteriile *Clostridium acetonobutylicum*, care produc fermentaţia acetonobutilică. Dupa fermentare rezultă o soluţie apoasă cu 2% amestec de butanol-acetonă-etanol care după distilare poate fi folosită drept carburol.

Etanolul este utilizat ca solvent, ca agent de extracţie şi agent antigel; serveşte de asemenea la sinteza a numeroşi alţi solvenţi, tincturi, substanţe farmaceutice, lubrifianţi, adezivi, detergenţi, pesticide, plastifianţi, explozivi şi răşini pentru fabricarea fibrelor sintetice. Utilizarea etanolului drept carburant în motoarele cu combustie internă se poate face sub formă de etanol anhidru (99,8 %), amestecat cu benzină în proporţie de maxim 20%, sub formă de etanol hidratat (94%) neamestecat cu benzină. În primul caz, etanolul modifică substanţial indicele octanic şi unele caracteristici de funcţionare ale motoarelor, ca demarajul, carburaţia şi emisiile de gaze. Valoarea economică a alcoolului amestecat cu benzină este cu 15 - 20 % mai ridicată decât cea a alcoolului utilizat ca substituient al benzinei.

Metoda cea mai simplă de producere a bioetanolului este aceea de a folosi biomasă de trestie şi sfeclă de zahăr care conţine zaharuri cu şase atomi de carbon, uşor fermentescibile în etanol. Trestia de zahăr şi sfecla

de zahăr conţin cantităţi substanţiale de zaharuri, şi de aceea unele ţări din UE (ex. Franţa) s-au axat, pentru producerea etanolului, exclusiv pe sfecla de zahăr. În Brazilia şi în majoritatea ţărilor tropicale care produc bioetanol, trestia de zahăr este cea mai utilizată materie primă. Costurile producerii de etanol din trestie de zahăr, în ţările calde, sunt printre cele mai scăzute comparativ cu producerea oricărui alt tip de biocombustibil (Mamma şi colab., 1995).

În uzinele care **prelucrează trestia de zahăr**, care sunt şi cele mai simple, trestia este spălată, măcinată şi celuloza este separată din sucurile dulci (fig. 26). Resturile lemnoase sunt uscate, apoi arse pentru a furniza energia necesară în proces. Sucurile dulci sunt concentrate, sterilizate şi apoi fermentate.

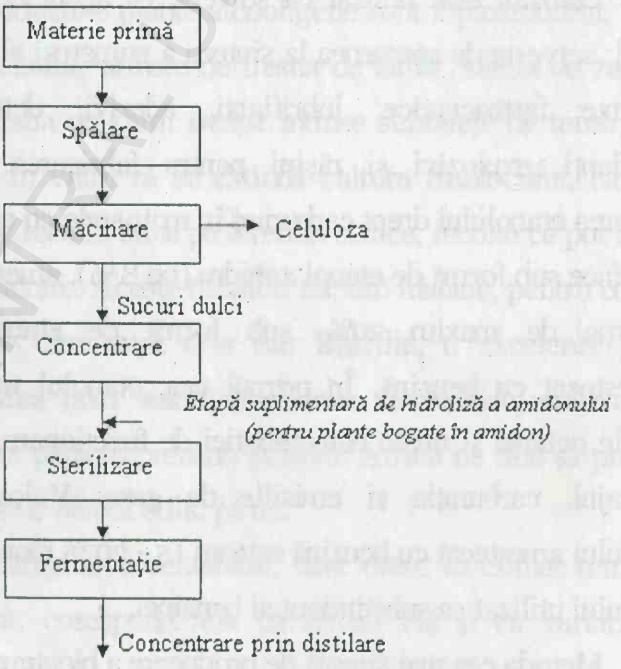


Fig. 26 Succesiunea operaţiilor unitare în tehnologia de obţinere a bioetanolului

Etanolul este separat de reziduurile solide ale fermentaţiei şi din soluţia alcoolică de 8–10% prin distilare. Lichidele reziduale sunt foarte poluante dar tratate corespunzător pot fi utilizate ca elemente fertilizante.

În uzinele **prelucrătoare de plante bogate în amidon**, este nevoie de o etapă suplimentară, cea legată de hidroliza amidonului în zaharuri fermentescibile; în plus, în absenţa resturilor lemnoase, este nevoie de o sursă de energie exterioară.

Eforturile de ameliorare a producţiei de bioetanol au avut ca obiect:

- dezvoltarea unei tehnologii de fermentare continuă pentru a obţine o concentraţie în alcool cât mai ridicată (12 % în loc de 8-10 %);
- sporirea randamentului energetic printr-o distilare mai eficace şi o mai bună recuperare a căldurii;
- randamente mai bune de separare.

3.2.2. Fermentaţia alcoolică

Fermentarea este definită ca un proces de degradare biochimică, sub acţiunea enzimelor, a unor produse naturale cu structuri complexe, în produse cu structură mai simplă. Prin acest proces se degajă întotdeauna energie, în majoritatea ei sub formă de energie calorică.

Fermentaţia alcoolică este tot un proces biochimic, spontan sau provocat, prin care glucidele sunt transformate în alcool etilic şi bioxid de carbon ca produşi principali, însoţiţi de o serie de produşi secundari. Procesul, de asemenea, este exoergic.

Descompunerea glucidelor în alcool şi CO_2 se produce în interiorul celulelor de levuri. Soluţia de zaharuri pătrunde prin membrana celulară, iar produsele fermentaţiei difuzează în mediu. Numai distrugând membranele celulare şi eliminând conţinutul lor prin presare devine

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

posibil de realizat fermentaţia în afara celulelor. În ambele cazuri însă procesul este determinat de activitatea levurilor pentru că acestea sunt microorganismele necesare desfăşurării procesului. Enzimele produse de levuri intervin în reacţiile de transformare a glucidelor după mecanismul general de acţiune al biocatalizatorilor. În principiu, enzima se leagă de molecula reactantă denumită generic substrat şi formează un intermediar enzimă-substrat. La rândul său acest compus intermediar se poate combina cu altă moleculă reactantă formând produşi de reacţie şi regenerând enzima.

Procesul de fermentaţie alcoolică este un proces anaerob. În acest proces, levurile îşi procură energia necesară îndeplinirii funcţiilor vitale din degradarea glucidelor fără intervenţia oxigenului.

Mecanismul biochimic al fermentaţiei alcoolice

Ecuaţia globală a fermentaţiei alcoolice, stabilită de Gay-Lussac, 1815 se prezintă astfel:

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2\,CH_3-CH_2OH + 2\,CO_2$$

Prin această ecuaţie se redă substanţa care se degradează şi produsele principale la care se ajunge. Ea nu cuprinde complexitatea fenomenelor care au loc în timpul fermentaţiei şi nici produşii secundari care apar alături de etanol şi bioxid de carbon. Ulterior au apărut numeroase scheme prin care s-a încercat să se explice mecanismul biochimic al procesului de fermentaţie alcoolică. În prezent este unanim recunoscută schema Embeden-Meyerhof-Parnas, numită şi glicoliză. Indiferent însă de produsele ce urmează a fi obţinute prin utilizarea în procese fermentative a levurilor din genul *Saccharomyces* calea biochimică universală prin care zaharurile simple sunt degradate într-un

BCU "ASSENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

mecanism generator de energie în compuşi de tip piruvat, cu trei atomi de carbon, poartă numele de glicoliză. Acest mecanism este întâlnit atât în regnurile vegetal şi animal cât şi la microorganisme de tipul fungilor (incluzând şi levurile) şi bacteriilor. Energia generată este stocată sub formă de ATP, în urma unui proces numit fosforilarea substratului.

Succesiunea reacţiilor ce generează mecanismul glicolizei este redată în fig. 27.

Conform acestei scheme, hexozele, respectiv glucoza şi fructoza, sunt transformate în acid piruvic, iar acesta, printr-o serie de reacţii, este transformat apoi în CO_2 şi etanol.

Glicoliza cuprinde trei etape:

- **fosforilarea hexozelor şi degradarea lor în câte două molecule de trioze;**
- **oxidarea, prin dehidrogenare, a triozelor cu formarea de acid fosfogliceric;**
- **transformarea acidului fosfogliceric în acid piruvic.**

Transformarea acidului piruvic în bioxid de carbon şi etanol are loc în alte două etape (fig. 28):

- **decarboxilarea acidului piruvic;**
- **reducerea acetaldehidei la etanol.**

Fosforilarea hexozelor şi degradarea lor în câte două molecule de trioze începe cu formarea esterilor fosforici ai glucozei şi fructozei. Prin transferul acidului fosforic de la ATP la hexoze are loc şi un transfer de energie. Esterii fosforici rezultaţi, mai bogaţi în energie decât hexozele corespunzătoare, sunt mai reactivi decât acestea şi ca atare participă cu mai multă usurinţă în reacţii. Se menţionează că glucoza-6-fosfat se izomerizează în fructoză-6-fosfat. Indiferent că se pleacă de la glucoză

BCU CLUJ-CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

sau de la fructoză, procesul de fosforilare din această etapă conduce la formarea de fructoză-1,6-difosfat. Acest ester, prin scindare formează două molecule de trioze care se găsesc sub formă de esteri fosforici.

Oxidarea, prin dehidrogenare este catalizată de enzima triozfosfat dehidrogenaza. Iniţial, prin participarea unei molecule de ATP rezultă acidul 1,3-difosfogliceric. Prin formarea moleculei de ATP, această reacţie reprezintă, din punct de vedere energetic, stadiul cel mai înalt al procesului de glicoliză.

Transformarea acidului fosfogliceric în acid piruvic începe prin formarea acidului 2-fosfogliceric cu participarea enzimei fosfoglicerat mutazei. Acidul 2-fosfogliceric, printr-o oxidare internă, se transformă în acid fosfoenolpiruvic în care se înmagazinează macroenergia eliberată la oxidarea internă ce a avut loc. Acesta, printr-o reacţie cu ADP, se transformă în acid enolpiruvic. Odată cu transferul acidului fosforic se transferă şi macroenergia de la acidul fosfoenolpiruvic la ADP. Acidul enolpiruvic, în urma unei reacţii, considerată spontană, trece în acid cetopiruvic.

Acidul piruvic format în ultima reacţie, este decarboxilat formându-se bioxid de carbon şi acetaldehidă. Prin această reacţie ireversibilă se formează unul din produşii principali ai fermentaţiei alcoolice şi anume bioxidul de carbon. Produşii finali ai glicolizei sunt acidul piruvic şi 2 molecule de NADH. Celulele de levuri regenerează NAD^+, transferând specia H^+ unei molecule organice şi anume aldehidei acetice.

Reducerea acetaldehidei la etanol este numită şi etapa formării celui de al doilea produs principal al fermentaţiei alcoolice.

BCU "ION CREANGĂ" UNIVERSITY LIBRARY

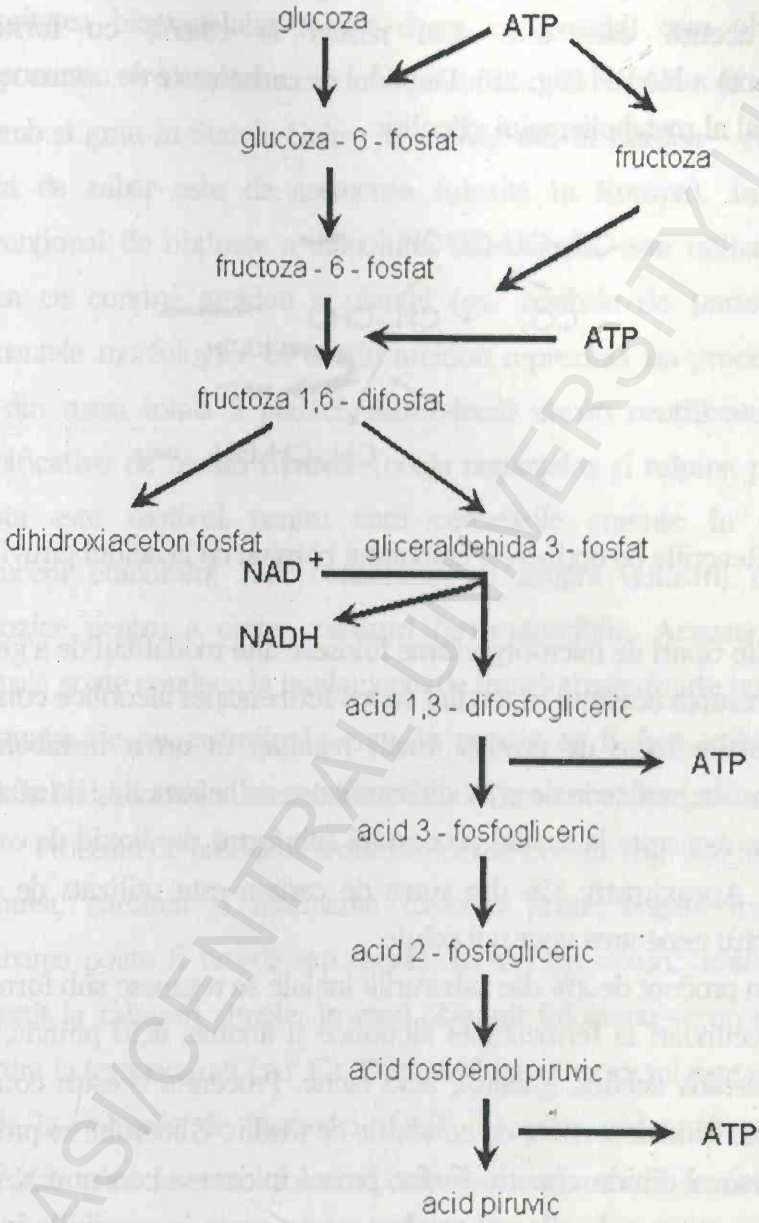


Fig. 27. Mecanismul biochimic al glicolizei

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În fermentaţia alcoolică, acidul piruvic este decarboxilat la aldehidă acetică care este apoi redusă la etanol, cu formarea concomitentă a NADH (fig. 28). Dioxidul de carbon este de asemenea un produs final al metabolismului glicolitic.

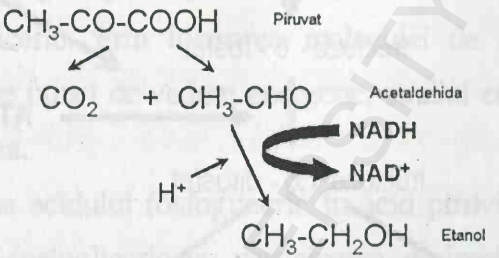


Fig. 28. Reacţiile de obţinere a etanolului pornind de la acidul piruvic

Alte tipuri de microorganisme folosesc alte modalităţi de a genera NAD^+. Prezenţa acestora în mediul supus fermentaţiei alcoolice conduce la o densitate mare de produşi finali rezultaţi în urma metabolizării zaharurilor. În mod teoretic 95% din cantitatea de hexoză iniţială aflată în substrat se regăseşte la finalul procesului sub formă de dioxid de carbon şi etanol. Aproximativ 1% din sursa de carbon este utilizată de către levuri pentru generarea unor noi celule.

Un procent de 4% din zaharurile iniţiale se regăsesc sub formă de produşi secundari ai fermentaţiei alcoolice şi anume: acid piruvic, acid acetic, aldehidă acetică, glicerol, acid lactic. Procentul acestor compuşi poate varia, fiind dependent de condiţiile de mediu. Glicerolul se produce din precursorul dihidroxiacetin-fosfat, proces în care se consumă NADH. De aceea cantitatea de glicerol produsă poate creşte în condiţiile în care acţiunea NAD^+ implicată în generarea acidului piruvic este limitată.

BCU IASI TECHNICAL UNIVERSITY LIBRARY

3.2.3. Producerea bioetanolului din cereale

Majoritatea bioetanolului folosit drept combustibil este obţinut din componenta ce conţine amidon a culturilor de cereale (în principal porumb şi grâu în Statele Unite, porumb şi orz în Europa – cu toate că sfecla de zahăr este de asemenea folosită în Europa). În procesul convenţional de obţinere a etanolului din cereale, este utilizată numai partea ce conţine amidon a plantei (ex. boabele de porumb). Însă segmentele morfologice ce conţin amidon reprezintă un procent relativ mic din masa totală a plantei, astfel încât rămân neutilizate cantităţi semnificative de resturi fibroase (coaja seminţelor şi tulpina plantelor). Acesta este motivul pentru care cercetările curente în domeniul producerii etanolului sunt concentrate şi asupra utilizării deşeurilor celulozice pentru a obţine zaharuri fermentescibile. Această utilizare raţională poate conduce la randamente de transformare foarte bune (90%) în comparaţie cu cazurile în care în proces ar fi fost utilizate doar amidonul şi zaharurile direct convertibile (Thra n şi Kaltschmitt, 2002).

Procesul de producţie a etanolului din cereale (fig. 29) începe prin separarea, sortarea şi măcinarea materiei prime bogate în amidon. Măcinarea poate fi umedă sau uscată. În ambele cazuri, amidonul este convertit la zaharuri simple, în mod obişnuit folosindu-se un proces de invertire la temperatură (70° C). Din acest punct procesul este similar cu cel de la culturile de trestie şi sfeclă de zahăr unde zaharurile sunt fermentate până la etanol folosind culturi selecţionate de levuri. Ultimul pas este distilarea etanolului până la concentraţia dorită.

BCU ASCENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

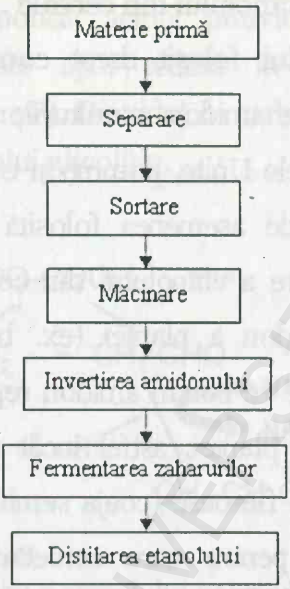


Fig. 29. Schema tehnologică a procesului de producţie a etanolului din cereale

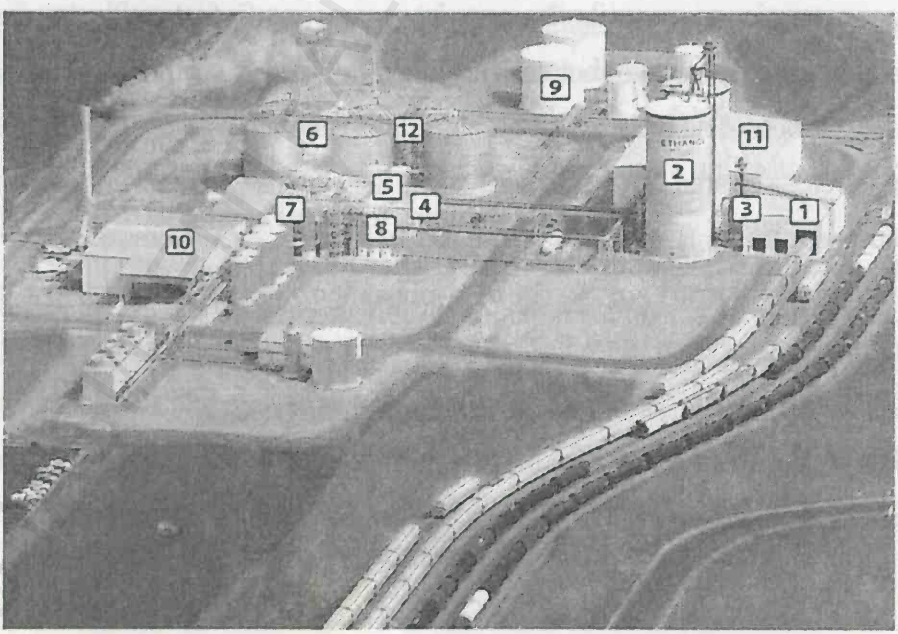
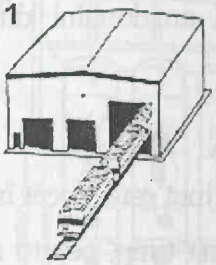


Fig. 30. Platformă de fabricare a etanolului din porumb

O unitate industrială de producere a bioetanolului (fig. 30) are în componență următoarele tipuri de utilaje (pe etape de lucru) necesare pentru realizarea operațiilor tehnologice prezentate anterior:

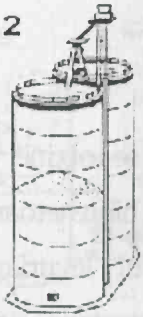
1



Livrarea cerealelor

Cerealele sunt transportate pe platforma industrială prin intermediul camioanelor sau pe șine. Materia primă este supusă controlului de calitate și apoi recepționată.

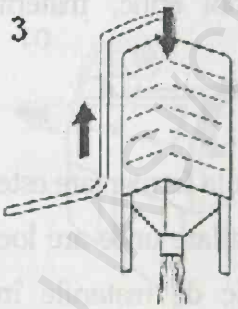
2



Stocarea cerealelor

Porumbul este încărcat în silozuri proiectate pentru o rezervă de până la 10 zile. În aceste 10 zile producția de bioetanol poate decurge normal.

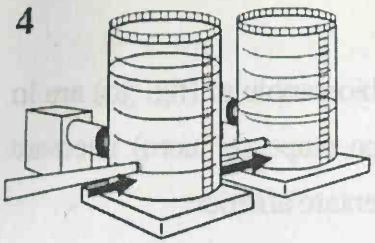
3



Măcinarea cerealelor

Cerealele sunt apoi supuse procesului de măcinare într-o moară cu ciocane.

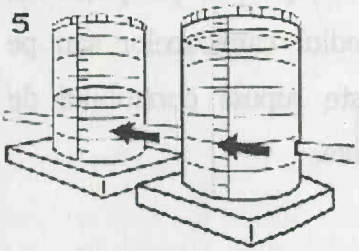
4



Tancurile de înmuiere

Cerealele măcinate în etapa anterioară sunt acum amestecate cu apă şi material enzimatic pentru a determina scindarea mai uşoară a amidonului din boabe.

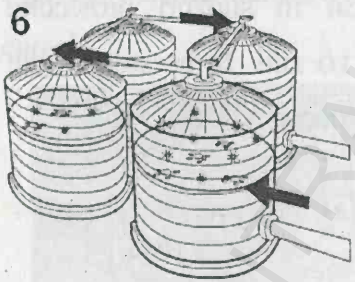
5



Lichefierea

Amestecul astfel obţinut este stocat în vase de lichefiere un anumit timp, pentru a permite enzimelor să hidrolizeze moleculele de amidon până la obţinerea de zaharuri fermentabile.

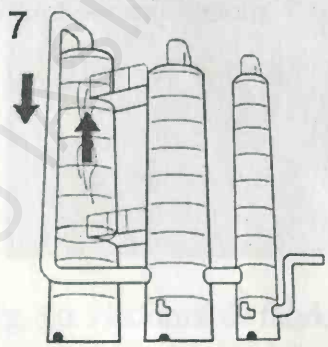
6



Fermentarea

În etapa de lichefiere se obţine o pastă care este transferată în bioreactoare unde este adăugat şi inoculul levurian. Urmează procesul de fermentaţie ce durează aproximativ 50 de ore, rezultând un amestec complex ce conţine particule solide, alcool etilic, materii organice, apă, produşi secundari ai reacţiei.

7



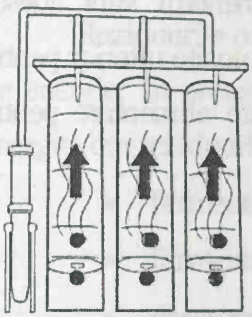
Distilarea

Amestecul rezultat la fermentare este trimis la coloanele de distilare unde are loc separarea alcoolului etilic de materiile în suspensie. Etanolul de concentraţie mare iese pe la partea superioară a ultimei

BCU BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITY LIBRARY

coloane de distilare, în timp ce reziduurile solide sunt trimise la partea inferioară a coloanei de unde sunt preluate şi trimise la procesarea produselor secundare.

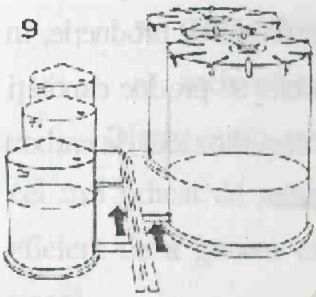
8



Deshidratarea

Etanolul rezultat conţine 5% apă şi de aceea este deshidratat pentru a obţine etanol anhidru. Pentru a îndepărta şi ultimele molecule de apă etanolul este trecut prin site moleculare.

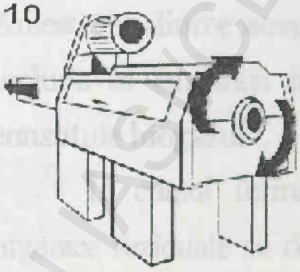
9



Denaturarea şi stocarea etanolului

O cantitate mică de benzină este folosită pentru denaturarea etanolului. Etanolul este denaturat pentru a nu fi utilizat în alte scopuri (ex: alimentar). Alcoolul astfel denaturat este apoi stocat pentru a fi trimis la un terminal unde este amestecat cu benzină.

10

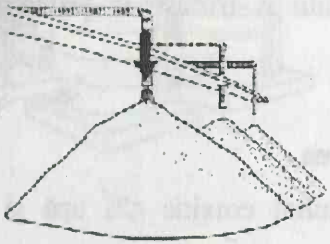


Separarea produşilor secundari

Amestecul de suspensii şi apă rezultat în urma distilării este separat prin centrifugare. În urma centrifugării rezultă apă cu o concentraţie de suspensii de 5% şi un depozit solid de resturi de cereale umed.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

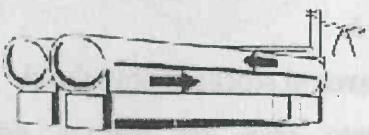
11



Uscarea produsului secundar

Resturile solide separate prin centrifugare şi care provin din boabele de cereale supuse fermentării sunt adesea trimise la uscare şi folosite ulterior pentru a produce suplimente alimentare pentru animale.

12



Reutilizarea dioxidul de carbon (produs secundar)

În timpul procesului de producţie, în etapa de fermentaţie, se produc cantităţi importante de dioxid de carbon. În unele întreprinderi dioxidul de carbon este captat, stocat şi comercializat ca produs secundar.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

3.3. Producerea de biogaz

3.3.1. Definiție și procedee de recuperare a energiei din reziduuri organice

Reziduurile organice din agricultură reprezintă resurse importante de energie. În prezent există șase procedee principale de recuperare a energiei din reziduurile organice agricole:

- fermentarea aerobă la temperatura mediului ambiant;
- fermentarea anaerobă la temperatură ridicată;
- descompunerea aerobă termofilă;
- distilarea destructivă (piroliza, hidrogenarea);
- compostarea;
- incinerarea și transferul de căldură.

Dintre aceste procedee, fermentarea anaerobă prezintă potențialul cel mai ridicat de recuperare a energiei și constituie procedeul cel mai eficient de a genera energie neconvențională (Bitir-Istrati și Minciuc, 2003).

Prin fermentare anaerobă, microorganismele descompun materiile organice, eliberând o serie de metaboliți printre care CO_2 și CH_4. **Amestecul dintre acești doi metaboliți cu predominarea CH_4, care include în cantități mici până la urme și alți metaboliți gazoși, constituie biogazul.**

În cursul fermentării anaerobe a amestecurilor de materiale organice reziduale se descompune, de regulă, până la 60% din materia organică inițială.

BCU IASI CENTRALA UNIVERSITY LIBRARY

Dintre componentele chimice ale materiei organice, grade mai ridicate de conversie în biogaz, au celulozele, hemicelulozele şi grăsimile, în timp ce proteinele prezintă grade mai scăzute şi variabile de conversie (tabel 8).

Tabelul 8

Cantitatea teoretică de biogaz care poate rezulta prin conversia energetică a unor substanţe organice pure

Natura substanţei	Biogaz (l /kg mat. Org.)	Conţinut în CH_4 (%)
Hidraţi de carbon	886	50
Grăsimi	1535	70
Proteine	587	84

Lignina nu contribuie la formarea biogazului sau contribuie foarte puţin (proces neelucidat încă).

Reziduul fermentat rămâne cu cantităţi apreciabile de materie organică şi aproape neschimbate de N şi S. Acestea se găsesc în componentele nedescompuse sau în diferiţi compuşi sintetizaţi de microfloră microbiană, care este activă în fermentarea anaerobă. O proporţie importantă de azot se găseşte în formă amoniacală (NH_3). Reziduul conţine cantităţi apreciabile de aminoacizi, enzime şi vitamine din complexul B (de la 2 la 5 miligrame vitamina B12 /kg reziduu).

P şi K şi microelementele (Ca, Mn, Zn, Fe) se menţin în aceleaşi cantităţi, dar au grade de mobilitate mai ridicate decât în materialul iniţial.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Datorită acestei compoziţii, reziduul fermentat poate fi folosit ca **îngrăşământ organic** pentru sol, pentru ridicarea fertilităţii şi chiar ca adaos vitamino-proteic, în cazul unor furaje, suport pentru culturi de alge sau hrană pentru peşti.

Este evident că fermentarea anaerobă reprezintă un procedeu complex de recirculare a energiei şi a elementelor minerale stocate în resturile organice lipsite altfel de valoare de întrebuinţare, dar caracterizate printr-un potenţial ridicat de depreciere a calităţii mediului ambiant (Nguyen şi colab., 2007).

3.3.2. Fermentaţia anaerobă. Fazele procesului. Bacterii metanogene

Fermentarea anaerobă folosită pentru producerea şi captarea biogazului este un **proces dirijat de descompunere a materiei organice umede, care se desfăşoară în incinte închise, în condiţii controlate de mediu, în lipsa oxigenului molecular şi a luminii.**

Spre deosebire de alte procese microbiologice dirijate de către om, fermentarea anaerobă pentru obţinerea biogazului nu foloseşte culturi pure sau condiţii sterile. În sistemele naturale în care se găseşte, materia organică decompozabilă este purtătoarea unei microflore foarte variate şi active; bacteriile metanogene nu cresc niciodată în culturi pure, ci numai în asociaţie cu o microfloră bogată, foarte diversă. Această microflora mixtă, în anaerobioză, asigură compuşii metabolici specifici dezvoltării metanobacteriilor. Materiale organice în curs de descompunere, folosite pentru alimentarea fermentatoarelor anaerobe, furnizează permanent o microfloră activă în procesul de metanogeneză şi reprezintă principalele surse de tulpini pentru obţinerea inoculului de

metanobacterii. De aceea, principalul obiectiv urmărit în procesul de metanogeneză îl constituie optimizarea factorilor de mediu şi tehnologici implicaţi în activitatea comunităţii de microorganisme responsabile de transformările materiei organice, cu accent deosebit asupra metanobacteriilor.

Pe baza cercetărilor microbiologice şi biochimice efectuate asupra animalelor erbivore rumegătoare ca şi în cazul fermentatoarelor anaerobe, s-a constatat că transformarea materiei organice în metan are loc în mai multe faze, după unii autori două, după alţii trei. În fiecare dintre ele acţionează în mod predominant sau aproape exclusiv comunităţi distincte de microorganisme (Jewell şi colab. 1976; Sursey 1979).

În cele ce urmează se vor accentua în deosebi aspectele de interes practic privind microbiologia procesului de fermentare anaerobă şi producere a biogazului. Sinteze valoroase asupra aspectelor fundamentale ale metanogenezei bacteriene au fost efectuate de Topală şi Kiss (1982) şi Hobson (1983).

Fazele procesului de fermentaţie anaerobă

Faza acidogenă (lichefierea)

În această fază acţionează microorganisme fermentative nespecializate, cu capacitate de hidroliză a materiei organice şi de producere a acizilor organici. Acestea sunt microaerofile şi facultativ anaerobe: bacterii celulozolitice, coliforme, propionice, lactice, butirice, acetice, lipolitice, proteolitice, precum şi numeroase specii de ciuperci şi unele drojdii. În această fază, ca şi în cea de metanogeneză, mai acţionează bacterii sulfat reducătoare şi denitrificatoare.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Lichefierea reziduurilor organice se produce prin hidroliză enzimatică a substanţelor macromoleculare care trec în substanţe cu greutate moleculară mică.

În reziduurile din zootehnie, **hidraţii de carbon** se găsesc sub formă de compuşi polimerizaţi, având celuloza ca o componentă principală, precum şi hemiceluloze şi alte polizaharide vegetale care nu au fost descompuse în procesul de digestie al animalelor. Datorită conţinutului ridicat de lignină acestea sunt relativ greu hidrolizabile, viteza lor de hidroliză constituind, în unele situatii, un factor limitativ pentru desfăşurarea într-un timp optim a fermentaţiei anaerobe. Din hidraţii de carbon hidrolizaţi rezultă zaharuri uşor fermentescibile de tipul arabinoză, xiloză, glucoză şi manoză. Aceste zaharuri servesc ca sursă energetică pentru înmulţirea microorganismelor implicate în transformarea celorlalte componente ale materiei organice.

Numeroase tipuri de bacterii celulozolitice implicate în descompunerea hidraţilor de carbon polimerizaţi au fost izolate din fermentatoare acţionând în zona de temperaturi mezofile. Activitatea lor specifică este potenţată, prin efecte necunoscute încă, de o serie de interacţiuni cu alte microorganisme din fermentator. Un exemplu de bacterie celulozolitică care acţionează în zona termofilă este ***Clostridium thermocellum***. Pentru degradarea hemicelulozelor tipul principal de bacterie este ***Bacteroides ruminicola***.

Lipidele sunt hidrolizate de microorganismele lipolitice, cu formare de glicerol şi acizi graşi cu catenă lungă.

Azotul, necesar pentru proliferarea microorganismelor din fermentator, se găseşte în reziduurile organice provenite din zootehnie, în constituienţi ai bacteriilor intestinale, ai secreţiilor şi celulelor epiteliale

BCU IASI CENTRALA UNIVERSITARA LIBRARY

intestinale, ai resturilor de furaje, sub formă de uree şi alţi compuşi cu azot neproteic, precum şi ca azot amoniacal.

Sub acţiunea microorganismelor proteolitice se produce descompunerea **proteinelor** cu formarea de amoniac (NH_3) care reprezintă principala sursă de azot pentru toate microorganismele din fermentator.

Majoritatea activităţii proteolitice din fermentatoarele anaerobe este desfăşurată de bacterii butirice din genul ***Clostridium***, mai fiind implicate, în mai mică măsura ***Bacteroides rumicola*** şi alte bacterii.

În urma descompunerii **aminoacizilor cu sulf**, bacteriile sulfat – reducătoare ca şi unele bacterii fermentative formează sulfuri. De asemenea, H_2S intră ca impuritate în compoziţia biogazului depreciindu-i calitatea. Peste anumite limite, el este toxic şi pentru populaţia microbiană din fermentator, ceea ce poate conduce la inhibarea procesului de metanizare. Datorită conţinutului apreciabil de metale grele din dejecţiile de animale crescute industrial, se formează însă sulfuri insolubile, care în urma precipitării nu mai influenţează în mod nefavorabil activitatea microflorei din fermentator. Efectul metalelor grele în formarea de sulfuri insolubile explică lipsa lor de toxicitate şi chiar o influenţă pozitivă asupra proceselor fermentative din instalaţiile de biogaz.

În partea finală a acidogenezei, mono şi dizaharidele sunt fermentate cu producerea în special de acid acetic, hidrogen şi bioxid de carbon, iar acizii cu catenă lungă şi acizii graşi volatili, cu mai mulţi atomi de carbon decât acidul acetic, sunt degradaţi până la acid acetic şi gaze.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

La încheierea acestei faze, predomină printre acizii organici volatili acidul acetic, alături de care se mai află substanţe organice şi gaze, precum şi vitamine şi enzime, care vor fi folosite de microorganismele metanogene în procesele lor metabolice (fig. 31).

Faza metanogenă (gazeificarea)

În această fază acţionează bacteriile metanogene, obligatoriu anaerobe, care sunt specializate în producerea de metan.

Hidrogenul şi bioxidul de carbon reprezintă un substrat caracteristic pentru metanogeneză. Majoritatea metanobacteriilor, studiate şi caracterizate până în prezent, folosesc ca substrat numai hidrogenul şi bioxidul de carbon. Metanul se formează prin reducerea bioxidului de carbon şi oxidarea hidrogenului gazos. ***Methanobacterium thermoautotrophicum*** reprezintă, până în prezent singura metanobacterie, "care utilizează hidrogenul", având activitate în zona temperaturii ridicate.

$$CO_2 + 4\,H_2 \longrightarrow CH_4 + 2\,H_2O + energie$$

Bacteriile metanogene, în afara speciilor ***Methanobacterium bryantii Methanobacterium thermoautotrophicum, Methanobrevibacter*** şi ***Methanosarcina barkeri*** pot folosi şi acid formic ca donator de H^+.

$$4H - COOH \rightarrow CH_4 + 3CO_2 + 2H_2O + energie$$

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

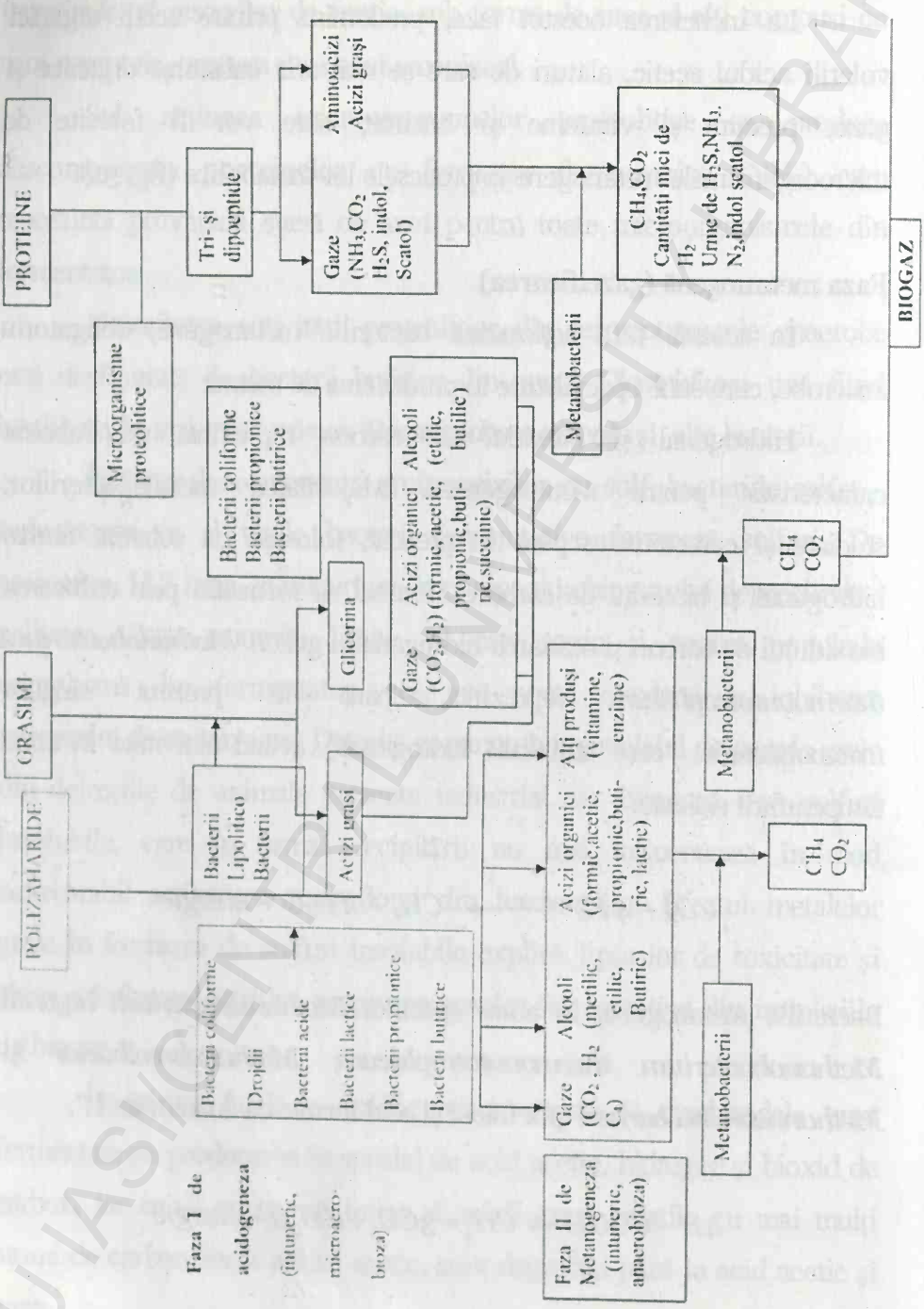


Fig. 31 Modul de desfășurare a fermentației metanogene

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

In cadrul microflorei anaerobe, metanobacteriile de tipul ***Methanosarcina barkeri*** pot folosi acetaţi pentru a fi transformaţi în metan şi dioxid de carbon.

$$CH_3 - COOH \rightarrow CH_4 + CO_2 + energie$$

Aceeaşi bacterie mai poate folosi metanolul şi metilamina ca donori de H^+:

$$4CH_3 - OH \rightarrow 3CH_4 + CO_2 + 2H_2O + energie$$

Folosirea rapidă a H_2 de către metanobacterii menţine o presiune scazută a acestui gaz în mediu, ceea ce constituie o condiţie esenţială pentru producerea lui în continuare.

Metanobacteriile ce folosesc acetaţii au un ritm de dezvoltare mai lent. De aceea, conversia acetatului în metan constituie un alt factor pentru desfăşurarea într-un timp optim a fermentării anaerobe. Energia produsă în reacţiile menţionate mai sus este folosită de bacteriile metanogene pentru menţinerea funcţiilor vitale şi pentru asimilarea carbonului, azotului, fosforului, sulfului şi microelementelor, cu care sintetizează substanţele necesare multiplicării celulare.

Principalele surse de carbon sunt bioxidul de carbon şi acidul acetic:

CO2 + energie ⟶ substanţe celulare

acidul acetic + energie ⟶ substanţe celulare

Bacteriile metanogene nu au capacitatea de a folosi în procesele de nutriţie acizii propionic, lactic, butiric, alcoolii superiori metanolului, proteinele sau aminoacizii. Pentru sinteza proteinei celulare, acestea

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

utilizează formele reduse ale azotului (forma amoniacală) şi sulfului (hidrogen sulfurat).

Faza de metanogeneză se încheie prin obţinerea biogazului. Acesta este un amestec gazos, de metan în proporţie de maxim 80% şi CO_2 20%, alături de care se găsesc cantităţi mici de H_2, H_2S, mercaptani, vapori de apă, urme de amoniac, de azot elementar, indol etc.

Bacteriile metanogene sunt foarte variate în privinţa însuşirilor morfologice, dar unitare din punct de vedere biochimic şi fiziologic; sunt singurele microorganisme care au o respiraţie strict anaerobă şi capacitatea de a produce metan prin procese metabolice.

Ca forme de viaţă dintre cele mai vechi pe Terra, bacteriile metanogene au fost incluse la nivel taxonomic superior în **regnul *Archaebacteria*** (Woese şi colab.,1978). Ele se deosebesc de toate celelalte bacterii prin trăsături **caracteristice:**

- extrema sensibilitate faţă de aciditatea mediului;
- lipsa mureinei din peretele celular;
- predominarea lipidelor poliizoprenice în compoziţia lipidelor celulare;
- structuri caracteristice secvenţelor nucleolitice din ARN.

Speciile de bacterii metanogene se deosebesc între ele, printre altele, şi după structura şi compoziţia peretelui celular, ceea ce le conferă o rezistenţă diferită faţă de substanţele bactericide şi bacteriostatice (Topala şi Kiss, 1982).

Bacteriile metanogene, fiind microorganisme strict anaerobe, necesită tehnici de cultură speciale pentru a fi obţinute în culturi pure de

laborator. Aceste tehnici costisitoare, descrise de Hungate şi Wolfe (citaţi de Hobson, 1983) implică îndepărtarea totală a aerului din mediu în timpul preparării culturilor.

3.3.3 Factorii care influenţează fermentarea metanogenă (digestia anaerobă)

Factorii care influenţează fermentaţia anaerobă sunt factori de mediu şi factori tehnologici. De optimizarea acestor factori depinde obţinerea unor randamente ridicate în bioconversia energetică a reziduurilor organice.

Factorii de mediu cu influenţe semnificative asupra fermentaţiei anaerobe sunt:

- temperatura;
- pH-ul;
- elementele nutritive;
- substanţele toxice.

Dintre **factorii tehnologici** trebuie retinuţi:

- compoziţia substratului organic
- mărimea încărcăturii organice – timp de retenţie – conţinut de substanţă uscată din substrat;
- omogenizarea;
- încălzire, izolare;
- inoculare cu microorganisme metanogene.

Temperatura - Viteza de creştere a metanobacteriilor şi, prin urmare, producerea biogazului depinde de temperatura din fermentator. Deşi obţinerea de biogaz este posibilă în domeniul de temperatură de la 0 la 60 grade Celsius, creşterea metanobacteriilor este mult încetinită sub 20

grade şi peste 55 grade Celsius. Au fost delimitate 3 domenii de temperatură în care se produce fermentaţia metanică:

- zona termofilă (peste 45 grade)
- zona mezofilă (între 20 si 45 grade)
- zona psihrofilă (criofilă sub 20 grade)

În practica curentă, fermentarea anaerobă a nămolurilor de la staţiile de epurare orăşeneşti se face în zona de temperaturi mezofile, temperatura optimă fiind cuprinsă în limitele 30 – 35° C (fig. 32).

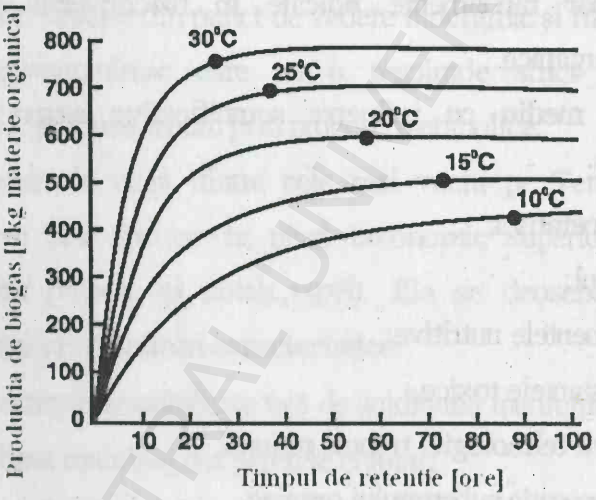


Fig. 32 Influenţa temperaturii şi a timpului de retenţie asupra producţiei de biogaz

Alegerea temperaturii de funcţionare a fermentatorului depinde atât de criterii biotehnologice cât şi economice. Fermentatoarele care funcţionează în zona termofilă produc biogaz cu o viteză mai mare decât cele care funcţionează în zona mezofilă. Viteza mai mare de producere a biogazului scurtează timpul de retenţie al substratului organic în fermentator. Ca urmare, volumul fermentatorului este mai mic şi

BCU "ASCENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

instalaţia costă mai puţin. Acest tip de instalaţie este indicat în zone climatice calde.

Fermentatoarele anaerobe din zona temperată funcţionează în zona mezofilă la temperaturi de 22-38°C. Principalul dezavantaj al acestei temperaturi de funcţionare este acela că determinând viteze mai lente de producere a biogazului, necesită perioade de retenţie mai îndelungate a materialului organic în fermentator.

Variaţiile bruşte de temperatură influenţează negativ activitatea microbiologică din fermentator. Dacă aceste variaţii sunt prea mari sau prelungite, producerea de biogaz poate să se oprească complet. Aceasta este determinată de ruperea echilibrului dintre faza de acidogeneză şi metanogeneză, întrucât metanobacteriile sunt mult mai sensibile la variaţiile bruşte de temperatură decât celelalte microorganisme.

Astfel de situaţii se întâlnesc în instalaţiile de capacitate mică, în timp ce în instalaţiile de capacitate mijlocie şi mare, procesul poate suporta scăderi de temperatură de până la 5°C, dar nu mai mult de 48 ore.

PH – ul - Stabilitatea procesului de producere a biogazului ca şi calitatea acestuia depinde de pH-ul materialului supus fermentaţiei. Metanobacteriile sunt foarte sensibile la pH-ul mediului. Ele se dezvoltă cel mai bine dacă reacţia este neutră, respectiv la pH de 6.8 – 7.2, dar pot tolera un domeniu mai larg de pH cuprins între 6.7–8.0. Aceste microorganisme sunt sensibile şi la variaţiile bruste de pH. În condiţii normale, dejecţiile de animale, mai ales cele proaspete, deţin suficientă alcalinitate pentru a menţine pH-ul din fermentator în domeniul 7.0 – 8.0.

Apar şi situaţii când, datorită proiectării improprii sau exploatării defectuoase a instalaţiei, echilibrul între activitatea microorganismelor

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

producătoare de acizi şi cea a metanobacteriilor este rupt şi pH-ul scade. Într-o primă etapă va creşte în biogaz proporţia de CO_2 faţă de CH_4; dacă pH-ul continuă să scadă va înceta total producerea de biogaz.

Pentru menţinerea pH-ului în domeniul optim fermentării metanice prin prevenirea acidifierii excesive, este indicat introducerea de substanţe alcalinizante, stabilizatoare de pH: apă de var, var pastă, carbonat de calciu, fosfat de calciu, apă amoniacală, hidroxid de sodiu soluţie 40 % (tabel 9).

Tabelul 9

Substanţe stabilizatoare de pH în fermentarea anaerobă metanogenă

Substanta	Forma în care se adauga	Cantitatea de adaugat la 1 m^3 de materie organica [L sau kg]
Apa de var (10 kg var nestins în 100 L apa)	soluţie	10
Var pastă (25-30 kg var nestins la 100 l apa)	pastă	5
Carbonat de calciu	pulbere	5
Fosfat de calciu	pulbere	4-5
Uree tehnică Apa amonicală 15-20 %	pulbere soluţie	3-4 8-10
Hidroxid de sodiu 40 %	soluţie	4-5

Elemente nutritive - Produsele organice reziduale din agricultură conţin cantităţi suficiente şi în raporturi echilibrate din toate elementele esenţiale pentru nutriţia microorganismelor.

BCU "ASIC CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Substanțe toxice - Orice substanță care inhibă activitatea microorganismelor metanogene sau care este letală pentru acestea prezintă un pericol potențial pentru procesul de fermentare anaerobă. Ex: produse antimicrobiene (antibiotice), prezența unor cantități excesive de NH_3, etc.

3.3.4. Metode de îmbunătățire a performanțelor fermentatoarelor

În ultimii ani, au fost depuse eforturi semnificative pentru găsirea unor căi de îmbunătățire a performanțelor procesului de fermentare anaerobă în special la tratarea deseurilor solide, caracterizate de prezența într-o proporție mare a macroparticulelor. Tratamentele pentru mărirea gradului de biodegrabilitate pot fi biologice, fizico-chimice sau mecanice.

Pre-tratarea biologică

Viteza hidrolizei anaerobe este o funcție dependentă de populația microbiană și sursa principală a enzimelor hidrolitice. Adăugarea, în masa de materie organică supusă fermentării a unor complexe enzimatice, îmbunătățește substanțial performantele fermentării anaerobe având ca efect vizibil cresterea cantității de metan obtinut și reducerea reziduurilor solide în comparație cu fermentarea deseurilor netratate. Hasegawa și Katsura (2003) au raportat o creștere cu 50% a producției de biogaz în cazul prevederii unei faze preliminare aerobe realizată cu o ușoară încălzire, înaintea introducerii materialului în fermentator în vederea descompunerii anaerobe. Aceștia sugerează că bacteriile aerobe termofile secretă enzime care dizolvă deșeurile organice într-un mod mult mai activ.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Pre-tratare fizico-chimică

Tratamentele fizico-chimice sunt utilizate des pentru creşterea solubilității materiei organice. O metodă des folosită de pretratare termochimică constă în adăugarea de hidroxid de sodiu în condiții de menținere a substantei la o temperatură de 120-175°C, un pH în intervalul 11-12, timp de 30 minute până la o oră. Se obține astfel o solubilizare de 60-70%. La creşterea presiunii şi temperaturii, conținutul organic al deşeurilor este divizat în fragmente cu catenă scurtă care sunt uşor procesate de către microorganisme (Karim şi colab., 2005).

Pre-tratarea mecanică

Pre-tratarea prin dezintegrare mecanică – reducerea dimensiunilor particulelor constituente – are un efect benefic asupra biodegradabilității materialului organic. Scopul evident este creşterea suprafetei specifice de contact. Au fost observate două efecte: în primul rând, dacă material primă supusă fermentației are un conținut mare de fibre, este greu biodegradabilă, mărunțirea conducând la o producție mai mare de gaz, iar în al doilea rând, reducerea dimensiunilor particulelor are ca efect o fermentare mai rapidă.

S-a observat o creştere cu 25% a cantității de biogaz obținut din gunoiul de grajd în urma pretratării întregii cantități într-un macerator, înainte de fermentare (Asociația Română de Salubritate, 2004). În general, cu cât dimensiunile fibrelor sunt mai reduse cu atât potențialul de generare a biogazului este mai mare. Dimensiunea recomandată a particulelor, pentru optimizarea procesului de fermentare anaerobă, este de max 5 mm. Echipamentele utilizate pentru tratarea mecanică sunt:

- amestecătoare mecanice;

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- prese cu șurub cu funcționare lentă;
- mașini de tăiat cu rotor, cu viteză mică;
- pompe cu lame de tăiere integrate.

Cercetări efectuate la instalatia de biogaz Kolinany (Nitra – Slovacia) au dovedit influența semnificativă a pretratării mecanice a biomasei asupra producției de biogaz. Deși nu se poate evalua cu exactitate gradul de la care acest tratament influentează generarea biogazului, este evident că de fiecare dată când se foloseste biomasă tratată mecanic, producția de biogaz este mai mare. (Asociația Română de Salubritate, 2004).

3.3.5.Tipuri de instalații de biogaz

In China sunt răspândite pe scară mare tehnologiile neindustriale de producere a biogazului. Astfel există milioane de instalatii simple, de capacitate mică, la nivel familial, amplasate în special în mediul rural. Unitățile de capacitate mijlocie, din cadrul fermelor, sunt încă relativ puține. Puterea calorică a biogazului generat este de 21.000-23.000 kJ/m^3. Pentru construcție se folosesc materiale traditionale locale (pietris, gresie, cărămizi, argilă, var) ciment și beton, oțelul fiind în proporție foarte mică sau lipsind total. În figura 33 este prezentată schema unui fermentator cilindric tipic. Prin amplasarea sub nivelul solului și acoperirea clopotului cu pământ, se reduc pierderile de căldură și se menține constantă temperatura necesară procesului.

In Statele Unite ale Americii sunt utilizate 2 tipuri de sisteme de fermentare:

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

a) Sisteme de fermentare cu alimentare continuă - Acest sistem include un tanc pentru prefermentarea dejecțiilor, echipamentul pentru manipularea fluidului și fermentatorul. Tancul de prefermentare se dimensionează pentru a reține cantitatea de dejecții generate în circa 2 zile la o fermă zootehnică. Este construit din beton armat, de formă paralelipipedică și amplasat sub nivelul solului. În figura 34 se prezintă schema tehnologică a unui sistem de fermentare cu alimentare continuă. O singură pompă asigură atât alimentarea fermentatorului din tancul de prefermentare precum și evacuarea reziduului din fermentator prin robineții R1 si R2.

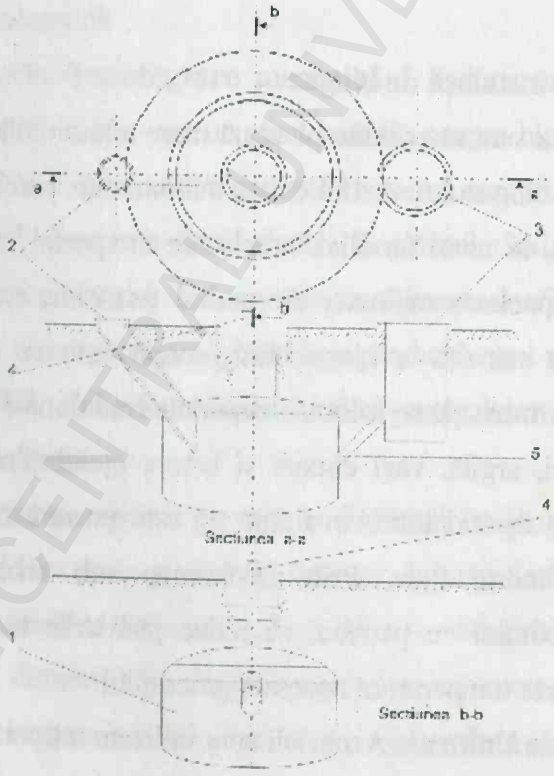


Fig. 33. Schema unui fermentator cilindric: 1-Fermentator, 2-Conducta de alimentare, 3-Groapa pentru efluent, 4-Tub de gaz, 5-Evacuare efluent

BCU IASI CENTRALA UNIVERSITARA LIBRARY

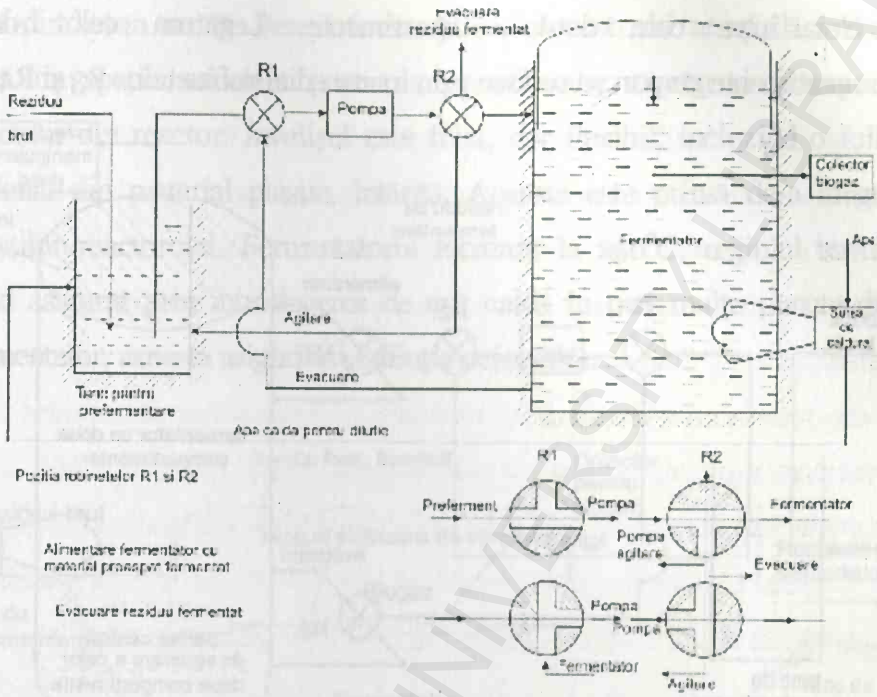


Fig. 34 Schema tehnologică a unui sistem de fermentare cu alimentare continuă

b) Sisteme de fermentare cu alimentare în șarje alternative

Schema tehnologică a unui astfel de sistem este prezentată în figura 35 Acest sistem are fermentatorul format din două compartimente de formă semicilindrică despărțite de un perete separator vertical, central.

În prima jumătate a timpului de retenție (de exemplu 10 zile) unul din compartimente este alimentat zilnic cu dejecții. În următoarele 10 zile, alimentarea înceteză în acest compartiment, dejecțiile semilichide fiind lăsate să fermenteze ca într-un sistem cu alimentare discontinuă. Concomitent începe alimentarea celui de al doilea compartiment. Alimentarea – fermentarea – evacuarea se repetă ciclic, cu alternarea

fazelor între cele două compartimente. Legătura celor două compartimente cu pompa se face prin intermediul robinetelor R3 şi R4.

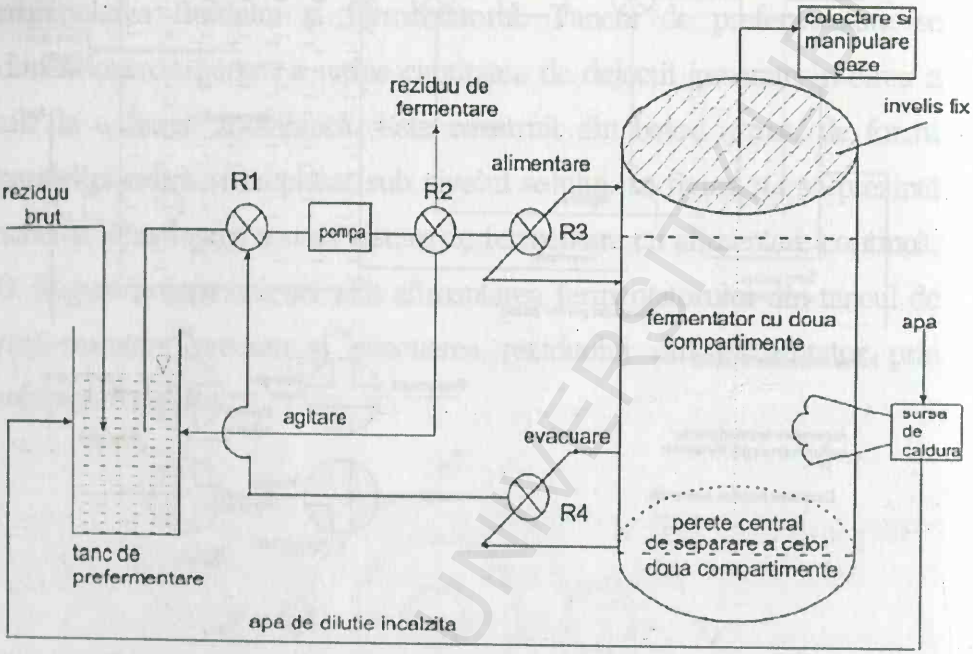


Fig. 35 Schema unei instalaţii de fermentare anaerobă cu alimentare în şarje alternative

c) Sistem de fermentare în structură lagunară cu alimentare în flux de tip piston

Sistemul este constituit dintr-un tanc de prefermentare, un fermentator lagunar cu flux de tip piston şi un tanc de prefermentare, amplasate sub nivelul solului (fig. 36).

Tancul de prefermentare are o capacitate de retinere pentru două zile şi alimentează fermentatorul prin dislocare gravitaţională a dejecţiilor semilichide din interiorul acestuia. Pereţii laterali şi podeaua sunt din pământ căptuşit cu argilă, iar cei ai fermentatorului propriu-zis

BCU IAŞI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

sunt din beton armat. Pereţii fermentatorului sunt mai scurţi, lăsând la bază un spaţiu suficient pentru a permite alimentarea şi evacuarea fluidului din reactor. Învelişul este fixat, dar flexibil, incluzînd o folie izolantă din material plastic, întărită. Aceasta este prinsă de-a lungul pereţilor reactorului. Fermentatorul lucrează la 250°C, regimul termic fiind asigurat prin introducerea de apă caldă în mai multe puncte din fermentator, aceasta asigurînd şi diluţia dejecţiilor.

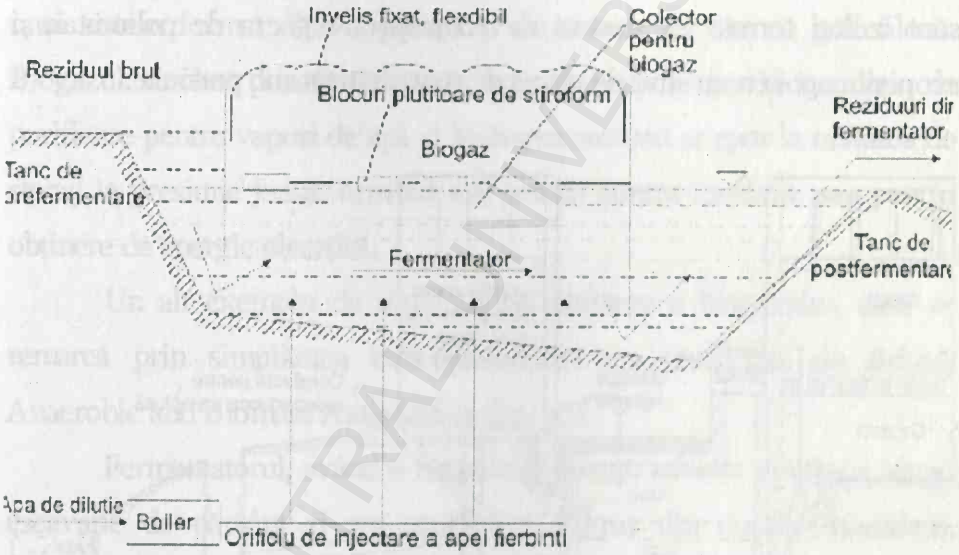


Fig. 36 Schema unui sistem de fermentare cu alimentare în flux tip piston

O altă instalaţie de biogaz cu funcţionare continuă (fig. 37) a fost proiectată de Biomass Energy Institute din Canada. Dejecţiile cad prin podeaua cu grătar a grajdului într-un şanţ adânc şi îngust, unde se colectează şi de unde sunt dirijate cu jet de apă spre fermentator.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Sistemul de alimentare funcţionează astfel încât să nu se producă scăpări de gaze în grajd. Pe măsură ce tancul de fermentare este încărcat cu dejecţii, efluentul se scurge spre o lagună. Nămolul care se acumulează la fundul fermentatorului este îndepărtat cu o pompă de vid obişnuită. Dejecţiile fermentate stocate în lagună sunt folosite pentru fertilizarea terenurilor agricole. Tancul de fermentare este din beton armat şi are o formă cilindrică cu o bază conică. Are un capac fix, prevăzut cu o supapă de siguranţă şi o gură de acces. Acoperişul fermentatorului şi pereţii lui sunt izolaţi termic cu straturi de 10 respectiv 5 cm de poliuretan şi acoperite apoi cu un strat de placaj de 0,01 m tratat sub presiune.

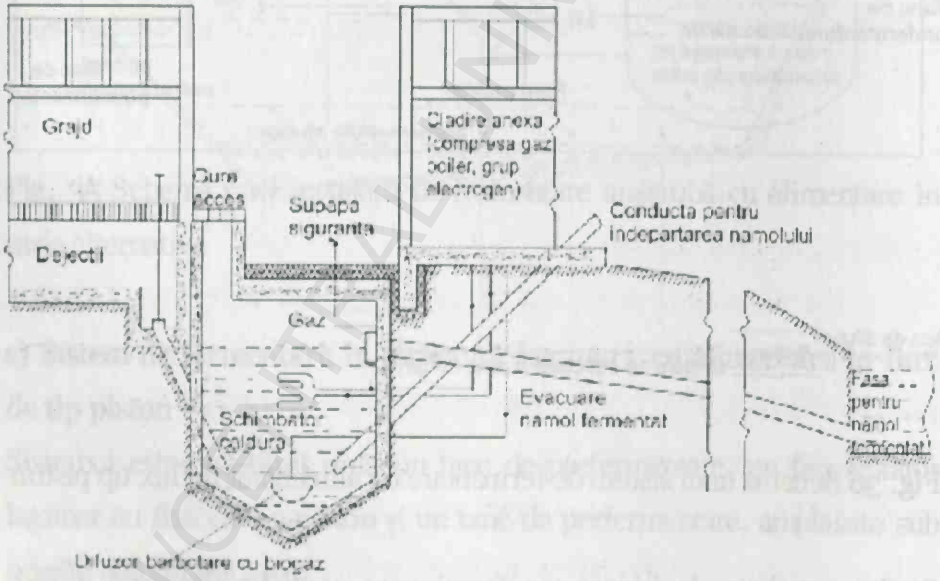


Fig. 37 Schema unei instalaţii prototip cu alimentare continuă de capacitate medie (Canada)

Capacitatea tancului se determină în funcţie de volumul zilnic al dejecţiilor şi de timpul de retenţie necesar pentru obţinerea unui randament ridicat al biogazului la temperatura de 35°C. Sistemul de încălzire constă dintr-un boiler, un schimbător de căldură şi echipamentul necesar pentru menţinerea temperaturii constante în fermentator chiar în cazul în care temperatura mediului exterior atinge -20°C. Încălzirea apei se face cu biogaz sau, în caz de nevoie cu propan. Omogenizarea dejecţiilor din fermentator se face prin recircularea biogazului cu ajutorul unui sistem format dintr-o pompă şi un sistem de ţevi de polietilenă. Biogazul rezultat prin fermentare anaerobă este condus la instalaţia de purificare pentru vapori de apă şi hidrogen sulfurat şi apoi la unitatea de stocaj la presiune joasă, urmând a fi folosit pentru încălzire sau pentru obţinere de energie electrică.

Un alt exemplu de instalaţie de obţinere a biogazului, care se remarcă prin simplitatea conceptiei este cea proiectată de British Anaerobic and Biomass Association (fig. 38).

Fermentatorul, având o capacitate de 337 m^3 este amplasat într-o escavaţie de pământ şi are acoperişul format din cupole modulare. Fiecare cupolă, de 6 x 2 m, este angrenată de celelalte cupole prin intermediul unor prese de beton în formă de T. În ansamblu, ele se constituie într-un clopot plutitor. Presele de beton asigură şi greutatea necesară pentru comprimarea gazului sub cupole, unde acesta se acumulează ca într-un gazometru.

Dintre avantajele acestui sistem de acoperire a fermentatorului se menţionează:

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- folosirea unui clopot plutitor asigură atât colectarea cât şi înmagazinarea gazului fără a mai fi nevoie de recipiente de presiune;
- fermentatorul poate fi menţinut fără a fi scos din funcţiune, prin îndepărtarea cupolelor rând pe rând;
- schimbătorii de căldură pot fi îndepărtaţi fără oprirea procesului de fermentare;
- nu este necesară o unitate de stocare auxiliară pentru gaz;
- operatorul poate urmări uşor ceea ce se întâmplă la suprafaţa instalaţiei.

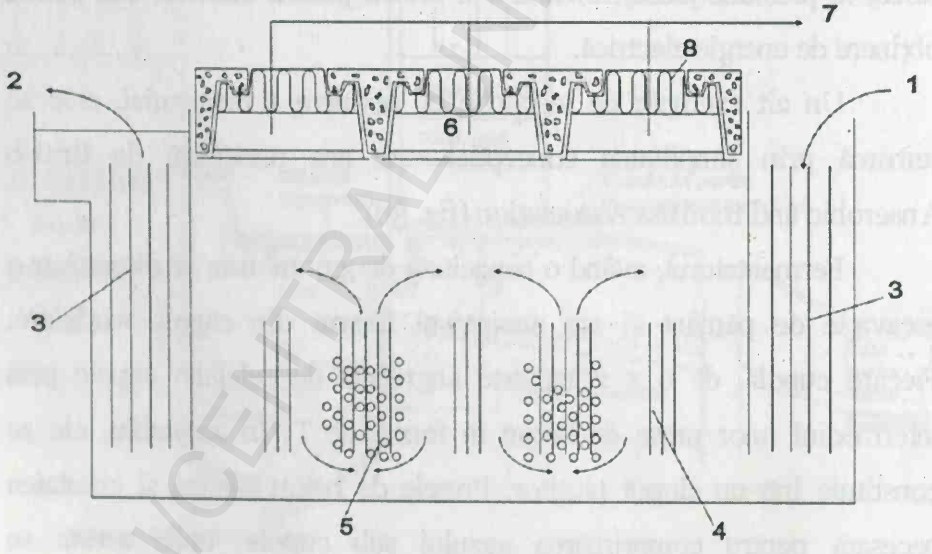


Fig. 38 Schema unui fermentator de tip lagunar cu cupole mobile: 1-Intrarea dejecţiilor semilichide; 2-Evacuarea dejecţiilor fermentate prin pompare; 3-Schimbător de caldură; 4-Panouri de încălzire a fermentatorului; 5-Sisteme de agitare a fluidului; 6-Inmagazinarea biogazului; 7-Conducta de evacuare a biogazului; 8-Izolare.

BCU "MIRCEA CEL BĂTRÂN" UNIVERSITY LIBRARY

Fermentatorul este alimentat cu dejectii diluate având un conținut de substanță uscată de 10 – 12%. Sub fiecare cupolă se găsesc sisteme adecvate pentru agitarea fluidului, care s-au dovedit eficiente pentru combaterea formării crustei, precum și posibilități de inoculare cu metanobacterii active a dejecțiilor proaspete. Dejecțiile fermentate sunt evacuate prin pompare în lagune, și sunt aplicate pe terenurile agricole în timpul verii. Biogazul, înmagazinat sub cupole este trecut printr-un filtru de apă pentru îndepărtarea hidrogenului sulfurat și a altor substanțe.

Tipuri de instalații de biogaz folosite în România

Instalații de capacitate mică și mijlocie - Instalația având o capacitate de 14 m^3 a fost concepută de un colectiv de specialiști de la Facultatea de Hidrotehnică a Universității Tehnice din Iasi și a fost realizată în gospodării rurale din judetele Iași, Botoșani și Suceava.

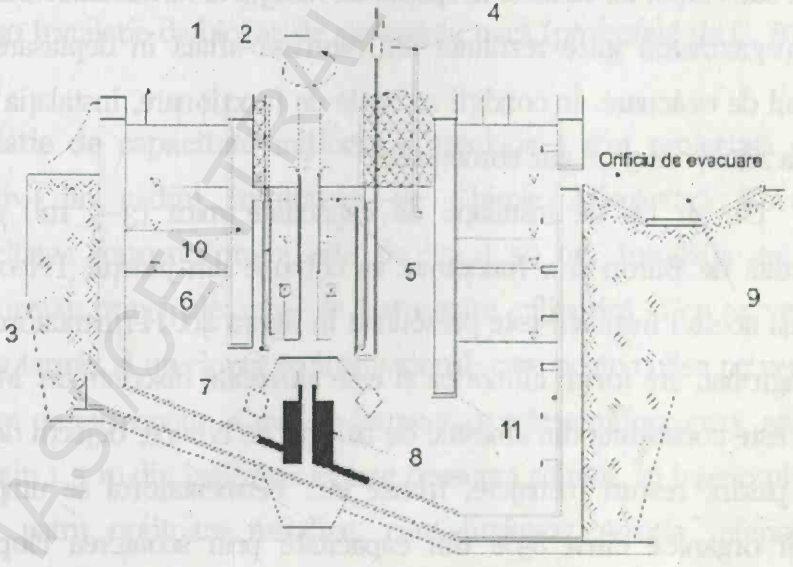


Fig. 39 Instalatie de biogaz de capacitate mică - 1 – podea de lemn;

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2 – agitator; 3 – perete exterior; 4 – conducta de evacuare gaz; 5 – lest de balast pe podea de lemn; 6 – clopot de tabla (gazometru); 7 – burlan de evacuare; 8 – bucşă de bronz; 9 – canal de evacuare; 10 – perete interior al camerei de alimentare; 11 – perete interior al camerei de evacuare.

Este compusă dintr-o cameră de alimentare, un bazin de fermentare, gazometrul şi camera de evacuare (fig.39).

Camerele de alimentare şi evacuare au forma unor cămine de vizitare, cu capace de lemn şi accesul pe trepte metalice. Instalaţia funcţionează la temperatura mediului ambiant, izolarea făcându-se cu un strat de paie şi gunoi de grajd. Producţia de biogaz stagnează dacă temperatura în fermentator scade sub 80-100°C. Pentru accelerarea procesului de fermentare se prevede un agitator cu palete care acţionează pe fundul fermentatorului. Acţionarea agitatorului este manuală prin intermediul unei manivele. Captarea gazului combustibil se face prin două guri, una situată sub clopot iar cealaltă în spaţiul de refugiu al fermentatorului unde se înmagazinează gaze rezultate din biomasa aflată în deplasare spre căminul de evacuare. În condiţii normale de funcţionare, instalaţia poate furniza zilnic cca 3 m^3 gaz combustibil.

Un alt tip de instalaţie de capacitate mică (3–5 m^3) a fost proiectată de Baron şi a funcţionat în comune din judeţul Teleorman. Schema acestei instalaţii este prezentată în figura 40. Fermentatorul este semiîngropat, are formă cilindrică şi este alimentat discontinuu. Materia primă este constituită din amestec de bălegar de bovine, dejecţii de porc şi de păsări, resturi menajere, frunze etc. Fermentatorul se umple cu materii organice circa 85% din capacitate prin scoaterea clopotului glisant. Clopotul poate culisa pe verticală, etanşarea sa realizându-se cu ajutorul unei gărzi acvatice (garnitură cu apă). Producerea biogazului

începe după circa 3 zile, în acest timp volumul materiei organice crescând cu 10–15%.

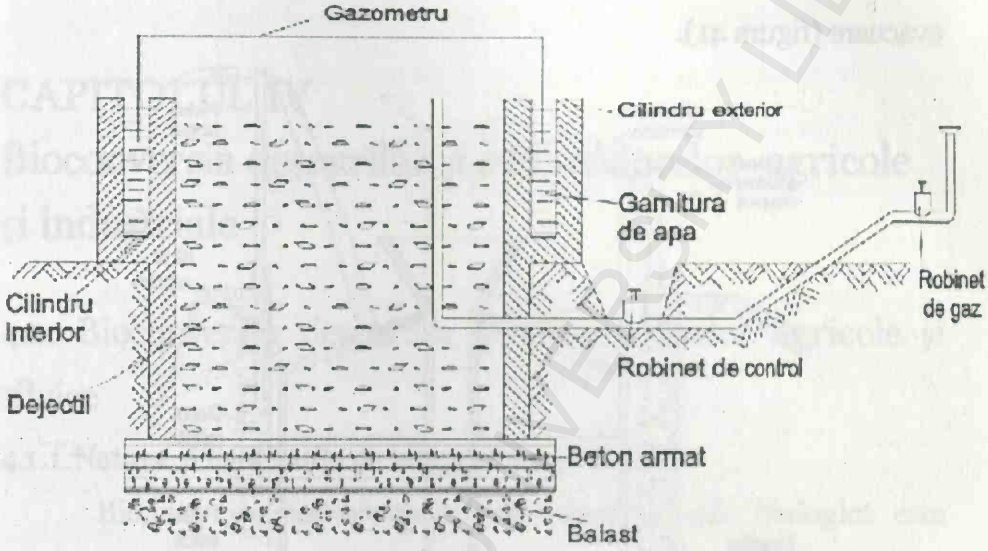


Fig. 40 Instalatie de biogaz de capacitate mică (proiectată de C. Baron - 1979)

Instalatie de capacitate mijlocie - Instalația a fost proiectată de un colectiv din cadrul Institutului de Chimie Alimentară Bucureşti. Capacitatea fermentatorului este de 25 şi 50 m^3. Instalația are două componente principale: cuva de fermentare, cilindrică şi cu ax vertical, izolată termic şi un clopot multifunctional, care poate culisa pe verticală în cuva de fermentare. Cuva de fermentare este semiîngropată, astfel că cel puțin 1,5 m din înălțimea ei este deasupra solului. În interiorul cuvei există patru opritoare metalice, care limitează poziția inferioară a clopotului. Instalația funcționează în regim mezofil, fiind prevăzută posibilitatea montării unui schimbător de căldură interior. Diluarea

materialului organic se face cu apă călduță. Alimentarea cu materiale organice se face printr-un tub care pătrunde prin axul clopotului, iar evacuarea materialului fermentat se realizează prin preaplin, cu tub de evacuare (figura 41).

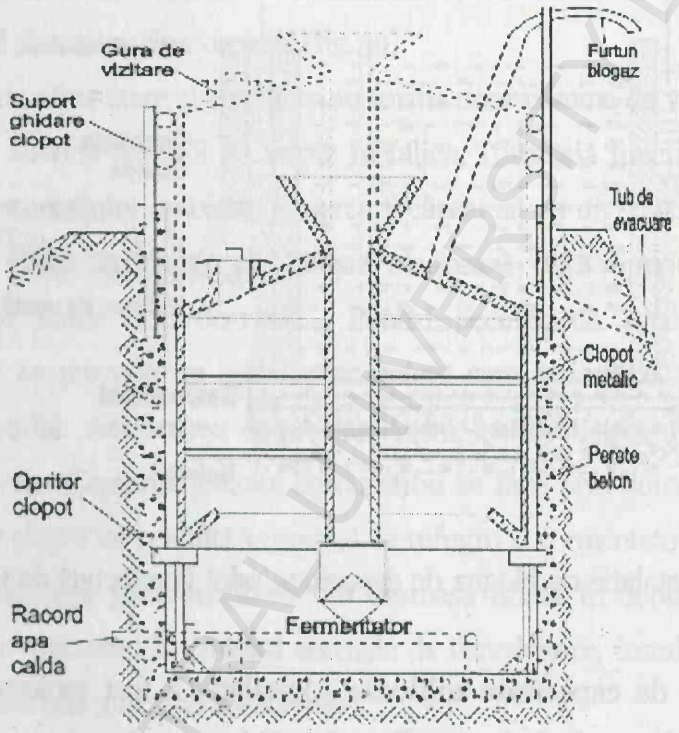


Fig. 41 Instalație de biogaz de capacitate mijlocie (25 - 50m^3)

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CAPITOLUL IV
Bioconversia deşeurilor şi subproduselor agricole şi industriale

4.1. Bioconversia deşeurilor şi subproduselor agricole şi silvice

4.1.1.Natura şi cantităţile de subproduse şi deşeuri

Biomasa vegetală destinată conversiei pe cale biologică este constituită din componentele de bază (celuloză, hemiceluloză, lignine) ale membranelor celulare de la plantele vii sau moarte supuse transformărilor. Aceste mase lignocelulozice, formate din poliglucide fermentescibile au fost şi sunt în prezent, prea puţin valorificate, deşi natura pune la dispoziţie cantităţi enorme de materii prime (tulpini ale plantelor lemnoase, paie de cereale, coceni de porumb, furaje, reziduuri de fructe şi legume din industria alimentară).

Din diverse specii de cereale, cultivate în lume, rezultă anual peste 1,7 miliarde tone de paie, din care cea mai mare parte se pierde prin mineralizare. De la cultura trestiei de zahăr şi din industria zaharului rămân anual 50 de milioane de tone de reziduuri şi 67 milioane tone de trestie măcinată. Acestea sunt insuficient folosite, cu toate că ar putea servi ca fertilizanţi pentru suprafeţele agricole sau ca furaje pentru animale. Cantităţi mari de deşeuri rămân şi de la fabricile de conserve de

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ananas unde se folosesc mai puțin de 20% din fructele întregi (European Biomass Industry Association, 2006).

În aceste condiții, valorificarea completă a acestor materiale, în deosebi prin hidroliza enzimatică a poliglucidelor componente şi trecerea lor în forme mai simple cu multiple utilizări, reprezintă un deziderat.

Compoziția principalelor surse de biomasă lignocelulozică este diferită în funcție de proveniență (tabel 10).

Tabelul 10

Conținutul biomasei lignocelulozice din diferite specii vegetale

Sursa vegetală	Celuloză (%)	Hemiceluloză (%)	Lignină (%)
Tulpini de pin	42,0	23,5	27,8
Tulpini de mesteacăn	38,8	37,3	19,5
Paie de grâu	34,0	27,6	18,0
Coceni de porumb	38,0	26,0	11,0

Celuloza este un polimer liniar, insolubil format din cca 10.000 molecule de glucoză, cuplate prin legături glicozidice de tip C_1-C_4 (fig. 42). Straturile celulozice din membranele celulare sunt protejate de o structură ligninică şi hemicelulozică, ceea ce frânează procesul de degradare sub influența diferiților factori.

Hemicelulozele sunt heteropoliglucide ramificate, mai uşor degradabile decât celuloza. Conțin, în amestec, molecule de xiloză (60-70%), arabinoză (10-15%) şi glucoză (15-30%), asociate cu celuloza în membrana primară şi secundară a celulelor vegetale.

BCU MSU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

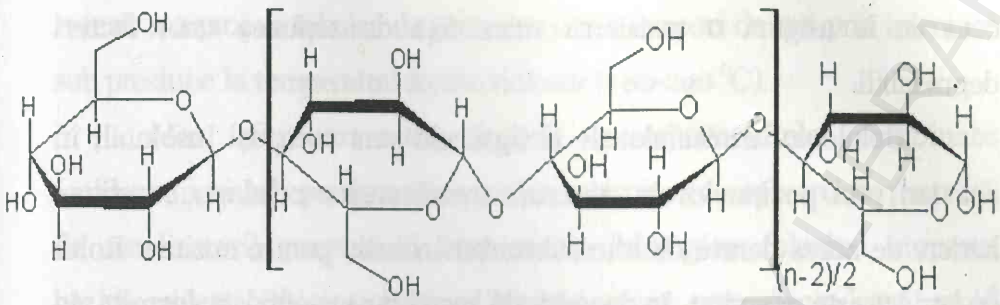


Fig. 42 Structura celulozei

Lignina reprezintă o componentă esenţială a lemnului, a doua în importanţă după celuloză. Separarea de celuloză, cu care este intim legată se bazează pe hidroliza acesteia cu acizii tari, urmată de obicei de dizolvarea celulozei degradate. Aceste operaţii brutale, produc probabil şi modificări în structura ligninei.

Lignina se formează prin copolimerizarea dehidrogenată a alcoolului p-hidroxicinamilic cu alcoolul coniferilic şi cu alcoolul sinapic. Această reacţie poate fi realizată şi " în vitro " în prezenţa fenol-oxidazei, obţinându-se lignine deosebit de pure.

Lignina este deci un compus cu structură polifenolică în care elementele C, H, O se află în proporţii ce variază cu specia vegetală şi vârsta plantei. Este o combinaţie aromatică, macromoleculară, amorfă, care umple toate spaţiile din jurul fibrelor de celuloză, unindu-le într-un agregat rigid.

Lignina reprezintă cca 70% din componenţa lamelei mediane care separă celulele vegetale între ele şi constituie un strat greu permeabil pentru accesul agenţilor hidrolizanţi în interiorul celulelor. Produsele de degradare enzimatică a ligninelor din membrane nu sunt fermentescibile,

BCU IASI - CENTRALA UNIVERSITY LIBRARY

ceea ce le asigură o rezistență mare față de acțiunea unor factori degradabili.

Celuloza, hemicelulozele şi ligninele sunt compuşi insolubili în apă iar, prin poziția lor în structura membranelor celulare, constituie bariere de acces pentru diferite substanțe, inclusiv pentru enzime. Rolul de barieră este exercitat, în deosebi, de membrana secundară formată, în principal, din lignină şi hemiceluloză care sunt asociate strâns, atât între ele cât şi cu fibrele de celuloză, prin diferite tipuri de legături (forțe Van der Waals, punți de hidrogen). Organizarea fibrilară şi pluristratificată a foițelor membranare ale celulelor precum şi prezența unor particule de încrustație, determină o slabă degradare enzimatică, pe cale naturală, a componenților pereților celulari. De aceea pentru a mări gradul de hidroliză este necesară aplicarea unor pretratamente fizico-chimice care să realizeze distrugerea matrițelor de lignină şi hemiceluloze precum şi mărirea suprafețelor substratului accesibil pentru enzime.

4. 1.2. Biodegradarea ligninei, celulozei şi hemicelulozelor

Pretratamentele şi hidroliza biomasei

Pretratamentele se bazează pe **solubilitatea ligninei şi a hemicelulozelor** în medii alcaline, calde şi pe **solubilizarea hemicelulozei** şi în medii acide şi calde. Pe aceste principii se aplică tratamente alcaline cu NaOH (8-12% în raport cu substanța uscată a substratului lignocelulozic), cu menținerea la temperatura de 80-120°C, pe o durată de 30-60 min. Pentru hidroliza completă a hemicelulozelor se recomandă şi un pretratament cu acid sulfuric (1-3%), pe o durată de 30 min., la temperatura de 120-130°C, folosind un reactor de percolare. Mai

recent, s-a propus tehnica de pretratament cu vapori de apă prin injectare sub presiune la temperaturi foarte ridicate (180-240 °C).

Mai eficiente s-au dovedit **pretratamentele combinate** (acide+vapori sub presiune), mecanice, chimice (cu solvenţi în prezenţă de catalizatori) precum şi **tratamente biologice** folosind ciuperca bazidiomicetă *Phanerochaete Chrysosporium*, care degradează rapid lignina (Popa şi colab., 2001).

După pretratament, urmează hidrolizarea biomasei lignocelulozice prin acţionarea enzimelor celulolitice specifice (celulaze, hemicelulaze, pectinaze). Aceste enzime sunt produse de ciuperca *Trichoderma reasii*, fie în formă mutantă, realizată printr-un program de ameliorare genetică, fie extrasă din pasta de molid.

Biodegradarea celulozei

Acest proces, care se bazează pe acţiunea enzimelor celulazice asupra celulozei, prezintă ca **avantaj** obţinerea unor produse mai omogene, lipsite de compuşi aldehidici sau cetonici care rezultă din transformarea glucozei în hidroliza acidă. Problema este de importanţă majoră dacă produsele reacţiei enzimatice se utilizează în alimentaţie sau fermentaţie. De asemenea, degradarea celulozei cu enzime celulazice este convenabilă din punct de vedere energetic (temperaturi şi presiuni scăzute) şi al poluării mediului înconjurător (nu rezultă deşeuri acide).

Dezavantajele proceselor de hidroliză enzimatică constau în aceea că este necesară o instalaţie complexă pentru producerea enzimei, iar scindarea celulozei este relativ lentă comparativ cu hidroliza acidă. Materialele celulozice trebuiesc supuse unor tratamente (fizice şi chimice) pentru a obţine eficienţa industrială scontată. De fapt, lipsa unui

BCU IAŞI CENTRALĂ UNIVERSITARĂ LIBRARY

procedeu de pretratare standard, cu efecte cunoscute şi economice, reprezintă principala cauză pentru care hidroliza enzimatică întârzie să fie industrializată pe scară largă.

Microorganisme şi enzime

Microorganismele care produc enzime ce hidrolizează legăturile β-glucozidice din lanţurile de celuloză, sunt larg distribuite în diferite grupuri taxonomice. Astfel, abilitatea de a utiliza celuloza este caracteristică: bacteriilor, actinomicetelor, fungiilor superioare.

Cu toate acestea numai câteva dintre acestea se caracterizează prin producerea unei activităţi enzimatice ridicate, necesară pentru a realiza "în vitro" degradarea celulozei insolubile până la zaharuri solubile (Popa şi colab., 2001):

- **bacterii:** *Clostridium thermocellum, Thermomonospora sp.; Cellulomonas sp., Streptomyces flavogriseus.*
- **fungii:** *Trichoderma reasei, Sporotricum pulverulentum, Penicillium funiculosum, Aspergillus wentii, Schizophyllum commune.*

Deşi natura multicomponentă a sistemului celulazic variază considerabil printre organisme, mecanismul de acţiune asupra substratului este similar. Bazat pe faptul că multe organisme capabile de a utiliza forme modificate chimic ale celulozei au o slabă activitate faţă de celuloza nativă, s-a presupus că microorganismul celulolitic produce cel puţin două celulaze: una denumită "C_1" care provoacă hidroliza celulozei native în catene polizaharidice mai scurte şi alta ,"C_x" responsabilă pentru scindarea acestora în molecule mici solubile, capabile de difuzie în celulă. Această ipoteză a fost modificată ulterior prin adăugarea altei

BCU ASCENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

enzime, clasificată ca celobioză, care hidrolizează produsul final de degradare a celulozei, celobioza, în glucoză.

Mai târziu, cercetările efectuate asupra acţiunii enzimelor faţă de substraturile iniţiale şi intermediare şi cele referitoare la activitatea componenţilor celulazici individual au condus la concluzia că, complexul enzimatic este alcătuit din patru componente (Popa şi colab., 2001):

- endo β-1,4-glucanaza;
- exo β-1,4-glucanaza;
- β-1,4-glucan-celubiozil hidrolaza;
- β-glucozidaza.

Endo β-1,4-glucanaza - în această grupă se include „C_x" cu activitate faţă de carboximetilceluloză. Rolul enzimei este de a scinda statistic catenele de celuloză şi se presupune că acţionează în principal asupra regiunilor amorfe din fibra de celuloză.

Exo β-1,4-glucanaza - această categorie de enzime separă o singură unitate de glucoză de la capătul nereducător al catenei de celuloză. Enzimele produc o creştere rapidă a cantităţii de zaharuri reducătoare şi o scădere lentă a gradului de polimerizare.

β-1,4-glucan-celubiozil hidrolaza - enzimele de acest tip separă o unitate de celobioză de la capătul nereducător al catenei de celuloză . Ele acţionează asupra regiunilor cristaline din fibra de celuloză şi pot fi considerate de tip "C_1".

β -glucozidaza şi celobiazele sunt enzime de bază care catalizează hidroliza celobiozei la produsul final glucoză, în biodegradarea materialelor celulozice.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Biodegradarea hemicelulozelor. Microorganisme şi enzime

Hemicelulozele constituie componenta polizaharidică care se degradează cel mai uşor sub acţiunea microorganismelor. În general, enzimele incluse în procesul de hidroliză a hemicelulozelor sunt produse de aceleaşi microorganisme care sintetizează şi celulaze. Astfel, sunt citate **fungiile:** *Myrothecium verrucaria, Aspergillus cryzae, Aspergillus niger, Aspergillus wenti, Trichoderma reasei, Pennicillium janthinellum, etc.*

Experimentele privind conţinutul de enzime care degradează hemicelulozele, efectuate pentru fungiile *Aspergillus niger şi Trichoderma*, au evidenţiat că toate preparatele enzimatice obţinute au în compoziţie alături de celulaze, glicozidaze şi enzime hemicelulazice. Dintre microorganismele considerate, *A.niger* se distinge printr-un potenţial mai ridicat de producere a hemicelulazelor.

Relaţia între structura hemicelulozelor şi enzime; mecanismul hidrolizei enzimatice.

Enzimele care acţionează asupra hemicelulozelor fac parte din categoria hidrolazelor şi sunt denumite ***enzime hemicelulolitice*** sau ***hemicelulaze.*** Aceste glican-hidrolaze degradează catenele principale ale poliozelor. Prin urmare hemicelulazele tipice sunt :

-β-D-galactanază;

-β-D-mananază;

-β-D-xilanază.

Aceste enzime sunt capabile să hidrolizeze nu numai glicozidele cu masa scăzută ci şi catenele scurte şi să elibereze monozaharidele care

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

reprezintă ramificaţii ale catenei principale hemicelulozice. Acţiunea glicozidazelor este necesară pentru a realiza hidroliza totală a hemicelulozelor până la monozaharide, deoarece enzimele menţionate acţionează sinergic cu hemicelulazele .

Asemănător majorităţii enzimelor care degradează polizaharidele, hemicelulazele acţionează asupra substratului în două moduri: **exo şi endo-hidrolitic** (Popa şi colab., 2001).

- **-o exo-enzimă** degradează poliozele prin separarea succesivă a unităţilor mono sau oligozaharidice, iar scindarea avansează în trepte, în mod obişnuit de la capătul nereducător al catenei polizaharidice.
- **-endo enzimele** acţionează într-o manieră statistică, provocând o hidroliză multiplă care este însoţită de o scădere marcantă a gradului de polimerizare a substratului. Polimerul este astfel degradat progresiv în fragmente mai scurte până la produse ce nu mai pot fi scindate (în mod obişnuit mono şi di-zaharide).

Biodegradarea ligninei

Degradarea microbiologică a ligninei (biolignificarea) oferă o serie de **avantaje** faţă de procedeele clasice (tabelul 11).

Pentru a putea controla procesul de biodelignificare se impune rezolvarea următoarelor probleme:

- selecţionarea de microorganisme cu agresivitate ridicată faţă de lignină;
- determinarea condiţiilor optime de cultură;
- realizarea de mutaţii;
- controlul sintezei enzimelor;

BCU MASTER CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- optimizarea treptelor catalitice care limitează viteza.

Tabelul 11

Analiza comparativă privind procedeele clasice de delignificare și cele biologice

Dezavantajele procedeelor actuale	Avantajele delignificării biologice (enzimatice)
Energointensive	Necesar scăzut de energie convențională
Incompatibilitate cu mediul ambiant	Compatibilitate cu mediul ambiant
Utilizarea moderată a resurselor (randament de conversie)	Înaltă selectivitate și activitate a enzimelor
Consum mare de agenți chimici	Catalizatori regenerabili
Produse ligninice care conțin sulf	Produse ligninice lipsite de sulf

Microorganisme cu activitate lignolitică

Principalele grupe de microorganisme care degradează lignina sunt prezentate în tabelul 12.

În prezent se consideră că aplicarea practică a biodelignificării este limitată datorită pe de o parte a lipsei de specificitate a microorganismelor față de lignină, iar pe de altă parte datorită vitezelor reduse ale proceselor de biodegradare.

Prin urmare o **primă etapă** importantă a realizării unui proces biotehnologic de biodegradare a ligninei o constituie **obținerea unei**

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

tulpini cu aptitudini îmbunătăţite de biodegradare, care ulterior să fie dezvoltată prin mutaţii şi adaptare.

Tabelul 12

Microorganisme cu capacitate de degradare a ligninei

Microorganism		Substrat
Actinomycetes	*Nocordia* *Streptomyces*	Lignină sintetică, tulpini de porumb, ţesut floemic de conifere
Fungi imperfecţi	*Fusarium* *Paulospora* *Paecilomyces*	Lignină sintetică, blocuri de lemn
Ascomycetes	*Chaetomium*	Blocuri de lemn, lignină sintetică, tulpini de porumb
Basidiomycetes	*Coriolus,* *Phanerochaete* *Lantinus, Pleurotus* *Gloeophyllus* *Poria, Coniophora*	Lemn Lignină sintetică

O a **doua etapă** este **optimizarea parametrilor de cultură** care includ nutriţia microorganismului, factorii de mediu, introducerea diferiţilor aditivi şi volumul culturii.

În a **treia etapă** se poate apela la **ingineria genetică** pentru a introduce genele dorite în tulpina producătoare.

BCU IAŞI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În general pentru a putea caracteriza un microorganism pentru capacitatea sa lignolitică se poate aplica următoarea metodă: un mediu care conţine lignină şi alte elemente nutritive este inoculat cu un microorganism test. După incubare în plăci Petri se efectuează un tratament cu o soluţie de clorură ferică/fericianură de potasiu. Zonele clare din jurul coloniilor indică degradarea ligninei.

Factori care influenţează biodegradarea ligninei

Lignina nu reprezintă o sursă de carbon pentru microorganisme în etapa de creştere primară şi pentru degradarea şi metabolizarea sa este necesară **prezenţa hidraţilor de carbon.** Astfel, fungiile *Phanerochaete chrisosporium* şi *Coriolus* necesită pentru creştere şi metabolizarea ligninei un cosubstrat de tipul celulozei sau glucozei.

S-a mai constatat de asemenea că pentru a realiza un metabolism biologic maxim, cu o degradare minimă a hidraţilor de carbon, **azotul din mediu trebuie limitat** iar concentraţiile ionilor sulfat şi fosfat şi ale celorlalte elemente nutritive să fie menţinute la niveluri adecvate.

Un alt factor care influenţează degradarea ligninei este **concentraţia oxigenului în mediul de cultură**, deoarece mecanismul de degradare a ligninei este oxidativ şi deci prezenţa oxigenului molecular într-o concentraţie cât mai ridicată în mediu este benefică.

4.1.3. Obţinerea de biomasă din deşeuri celulozice

Microorganismele utilizate pentru acest proces sunt *Candida utilis, Candida torulopsis, Candida robusta.* Pentru a deveni substrat ce poate fi utilizat de drojdii pentru producerea de biomasă, deşeurile

BCU IASI CENTRALA UNIVERSITY LIBRARY

celulozice trebuie hidrolizate acid sau enzimatic. Acest din urmă procedeu este preferat din motive economice şi de calitate a substratului obţinut.

Pentru a creşte susceptibilitatea deşeurilor celulozice, la hidroliza enzimatică este recomandat pretratamentul acestora cu alcalii (NaOH), tratament tip vîscoză sau cuproamoniacal. Hidrolizatul de celuloză se separă de fracţiunea netransformată şi constituie substratul pentru bioconversie.

Procesul **de bioconversie este aerob** şi se realizează într-un fermentator de tip "air-lift" la 35... 38° C şi la pH = 4,8-5,5, în fermentator fiind adusă şi soluţia de săruri minerale pentru sursa de azot şi fosfor. **Cantitatea de aer** pentru o bună biosinteză este de **8 – 12 m^3 aer / m^3** mediu de cultură. Menţinerea pH-ului în timpul biosintezei se face cu amoniac (Dan, 1999).

După obţinerea biomasei, aceasta se concentrează prin filtrare şi centrifugare în două trepte cu spălare după treapta întâia de centrifugare. În final materialul organic obţinut la separarea centrifugală se concentrează în evaporatoare şi se usucă prin pulverizare până la un conţinut de 8 – 10 % umiditate.

BCU IAŞI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

4.2. Biosolubilizarea accelerată a metalelor grele din „steril"

Ca rezultat al activităţii miniere desfăşurate de zeci de ani în diferite zone, s-au acumulat uriaşe depozite (halde) de steril, conţinând concentraţii crescute de ioni metalici sau elemente radioactive. Asemenea sedimente reprezintă severe surse de poluare a mediului, fenomen agravat şi de lipsa învelişului vegetal de pe suprafaţa unor astfel de halde. În România sunt prezente astfel de zone cu deşeuri miniere cum sunt cele cantonate la Baia – judeţul Tulcea şi Valea Sebei – judeţul Alba unde se prelucrează minereuri sulfurice cuprifere extrase de la Altân Tepe şi respectiv Roşia-Poieni. În ambele areale există condiţii pentru o biosolubilizare naturală a ionilor metalici conţinuţi în steril, sporind astfel riscul poluării mediului.

Dintre multiplele aspecte care fac obiectul biotehnologiilor, **recuperarea metalelor din deşeuri şi depuneri rezultate în urma exploatărilor miniere** reprezintă un domeniu de mare interes (Martin, 1991).

Prin aceste procese se urmăresc două aspecte:

- concentrarea ionilor metalici din soluţii prin activităţi de biosolubilizare şi biosorbţie;
- reducerea gradului de poluare a terenurilor contaminate cu depuneri de materiale reziduale conţinând ioni metalici.

Concentrarea ionilor metalici din soluţii prin activităţi de biosolubilizare şi biosorbţie - Sorbţia unor specii anorganice pe

biomasă, cu rol de sorbent, este denumită **biosorbţie.** Biosorbţia asigură o alternativă pentru tehnologiile de depoluare.

Biosorbţia ionilor metalici pe biomasă implică legături extracelulare şi intracelulare, interacţii complexe, dependente de natura ionului metalic şi de structura biosorbentului. Biosorbţia decurge prin **mecanisme de adsorbţie, complexare sau legare chimică.**

Iniţial are loc adsorbţia rapidă a ionului metalic, datorită interacţiei dintre acesta şi pereţii celulei, urmată de adsorbţia activă, lentă, produsă de transportul prin membrană a ionului în interiorul celulei.

La contactul cu o soluţie apoasă care conţine un ion metalic, biomasa poate reţine, în mai puţin de 10 minute, 90% din cantitatea de cationi. În continuare se desfăşoară etapa de adsorbţie lentă a metalului, care poate dura câteva ore, până la atingerea stării de echilibru.

Adsorbţia lentă sau activă a metalelor pe biomasă este influenţată de:

- activitatea metabolică a biomasei;
- pH-ul şi compoziţia mediului apos;
- concentraţia metalului în soluţia de analizat;
- temperatura şi prezenţa unor ioni competitivi.

Majoritatea microorganismelor vii manifestă mecanisme de dezintoxicare, care implică excluziunea metalului din celulă sau segregarea metalului în peretele celulei, complexarea cu polimeri extracelulari sau transformarea metalului prin reacţii redox. Biomasa microbiană conţine un număr mare de centri activi, care pot lega ionii metalici. Aceştia sunt reprezentaţi de grupele carboxil, carbonil, hidroxil,

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

fosfat şi tiol, conţinute de pereţii celulelor. Mecanismul de legare a ionilor metalici implică interacţii ionice între celulele încărcate negativ şi cationi, care se soldează cu flocularea microorganismelor, ca în cazul tratării apelor reziduale cu nămol activ.

Studiul izotermelor de adsorbţie a evidenţiat că în cazul biomasei de *Aspergillus niger* este posibil un proces de schimb ionic, între cationii uranil, care înlocuiesc reversibil cationii, fixaţi de aminoacizii constitutivi ai proteinei din pereţii celulei (Gorduza şi colab., 2002). Peptidoglicanul este agentul principal care determină depunerea metalului în pereţii celulelor de *Bacillus subtilis*, acţionând prin intermediul grupelor carboxil din acidul glutamic.

Metalotioneinele constituie un grup de proteine (enzime şi pigmenţi) care fixează specific cationii, prin complexare, recuperându-i din efluenţi apoşi.

Este de perspectivă modificarea genetică a microorganismelor, în vederea obţinerii de agenţi complexanţi ai metalelor. În acest context, se remarcă producerea metalotioneinelor prin clonarea genelor de metalotioneină umană şi exprimarea lor într-o bacterie.

Complexarea metalelor cu polimeri din pereţii celulelor permite microorganismelor să supravieţuiască în medii apoase, care conţin metale la concentraţii care ar fi letale dacă ar fi prezente în citoplasma celulei.

Recuperarea metalelor acumulate în biosorbenţi prin biosorbţie prezintă o serie de avantaje:

- Posibilitatea recirculării deşeurilor industriale, eliminând necesitatea depozitării metalelor;

- Posibilitatea reutilizării biosorbentului, ceea ce contribuie la reducerea costurilor implicate în generarea acestuia.

Eluarea metalelor din biosorbenți poate fie efectuată cu soluții alcaline (Na_2CO_3), acid etilen diaminotetraacetic sau cu soluții diluate de acizi minerali (HCl, HNO_3, H_2SO_4).

La utilizarea unor biomase ieftine (nămoluri) și reținerea metalelor prețioase sau rare (aur, argint, uraniu) se practică recuperarea cationilor prin incinerarea biosorbentului.

Pentru evaluarea factorilor de risc ai poluanților asupra mediului înconjurător și elaborarea unor strategii eficiente de control a calității mediului se impune descrierea interacțiilor între contaminanți și mediu, sau materialul sorbtiv, apelând la diferite modele.

Modelarea procesului de biosorbție pentru poluanții anorganici

Modelul complexării de suprafață (sau superficială) a fost aplicat și pentru descrierea adsorbției metalelor grele pe suprafețe minerale, în special pe suprafețele solide ale oxizilor hidratați. Aceasta constituie o abordare superioară a procesului, prin renunțare la metode empirice, respectiv la determinarea izotermelor de adsorbție și a parametrilor de distribuție corespunzători, care s-au dovedit a implica restricții.

Modelul echilibrului chimic a fost aplicat și pentru descrierea cantitativă a adsorbției metalelor grele pe nămoluri din râuri.

În cazul unei dependențe direct proporționale între constantele de adsorbție a metalelor și constantele inițiale de hidroliză, modelul

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

echilibrului chimic poate fi utilizat pentru determinarea concentraţiei de Cu, Ni, Pb şi Zn în apa râurilor (Gorduza şi colab., 2002).

Sedimentul are o grupă funcţională superficială medie, exprimată prin SOH. Protonarea şi deprotonarea suprafeţei sedimentului este exprimată prin reacţiile de mai jos:

$$SOH_2^+ \Leftrightarrow SOH + H^+ \qquad K_{a1}^{int}$$
$$SOH \Leftrightarrow SO^- + H^+ \qquad K_{a2}^{int}$$

Adsorbţia metalelor grele (M^{2+}) pe suprafaţa sedimentului poate fi reprezentată prin reacţiile de mai jos:

$$SOH + M_S^{2+} \Leftrightarrow SO^- - M^{2+} + HS^+$$
$$SOH + M_S^{2+} + H_2O \Leftrightarrow SO^- - MOH^+ + 2H_S^+$$

Adsorbţia din sistemele naturale este descrisă prin considerarea principiilor a trei modele de complexare superficială: modelul capacităţii electrice constante, modelul stratului difuz şi modelul stratului triplu.

Modelul capacităţii electrice constante, presupune un simplu plan, pe a cărui suprafaţă sunt adsorbiţi specific ionii.

Straturile dublu electric sunt de tip Helmholtz, cu caracteristici de condensator electric, cu o pereche de plăci în paralel şi capacitate electrică fixă (C) pentru fiecare dintre combinaţiile între temperatură, tărie ionică şi proprietăţile de electrolit. Modelul are trei parametri specifici (C, pk^{int}_{a1}, pk^{int}_{a2}).

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Modelul stratului difuz implică prezenţa în regiunea interfacială a două planuri: o suprafaţă pentru adsorbţia H^+, HO^- şi a speciilor adsorbite specific şi un plan al stratului difuz, spre care converg contraionii.

Distribuţia ionilor, sarcina şi potenţialul în stratul difuz sunt descrise prin ecuaţiile Poisson–Boltzmann. Pentru caracterizarea suprafeţei la diferite tării ionice se utilizează două constante: pk^{int}_{a1} şi pk^{int}_{a2}.

Modelul stratului triplu admite că în regiunea interfacială există trei planuri: o suprafaţă pentru adsorbţia H^+, HO^- şi a ionilor puternic adsorbiţi, o suprafaţă aproape plană pentru ionii slab adsorbiţi şi un strat difuz, reprezentând cea mai scurtă distanţă de acces spre sarcina disociată. Acest model este caracterizat prin şase parametri (C_1, C_2, pK^{int}_{a1}, pK^{int}_{a2}, pK^{-int}_{NO3}, pK^{-int}_{Na}) şi s-a dovedit eficient într-un interval larg de tării ionice. Aplicarea acestui model este dificilă, fiind aplicată pentru adsorbţia metalelor pe un sediment oxidic.

Modelele comlexării superficiale pot simula rezultatele experimentale, în anticiparea comportării la adsorbţie a sedimentelor acvatice naturale (tabelul 13).

Tipuri de inocul bacterian utilizate pentru biosorbţie

In prezent sunt cunoscute o multitudine de tipuri de microorganisme utilizate în procese de biosorbţie, specifice pentru unul sau mai multe metale (tabel 14). Se pot utiliza de asemena şi trei categorii de culturi mixte (Volesky şi Holan, 1995):

- **bacterii chemolitotrofe acidofile** (de tip ***Thiobacillus***)

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- bacterii heterotrofe acidofile;
- amestec de bacterii heterotrofe acidofile şi bacterii chemolitotrofe acidofile.

Tabelul 13

Modelele complexării superficiale în sorbția Cu(II) şi Cd(II) pe sedimente naturale

Ioni sorbiți	Constante	Modelul a	Modelul b	Modelul c
Cu (II)	$\log K^{int}_{M^{2+}}$	-0,766	-1,247	0,058
	$\log K^{int}_{MOH^-}$			-4,599
Cd(II)	$\log K^{int}_{M^{2+}}$	-1,960	-2,585	-0,455
	$\log K^{int}_{MOH^-}$			-6,385
	$C_1(F/m^2)$			1,60
	$C_2(F/m^2)$	1,66		0,20

Tabelul 14

Tipuri de microorganisme utilizate în procesele de biosorbție

Nr.	Denumire	Specie	Metal biosolubilizat
1.	*Aeromonas hidrophilia*	Bacteria/ species	
2.	*Aspergillus terres*	Fungi/species	
3.	*Aspergillus niger*	Fungi/species	Ag
4.	*Aspergillus arysae*	Fungi/species	
5.	*Aspergillus foetidus,*	Fungi/species	
6.	*Aspergillus carbonaris*	Fungi/species	Cu, Cr

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

7.	*Aureobasidium pullulans*	Fungi/species	Pb
8.	*Azolla filiculoides*	Eukaryota, ,Viridiplantae/ species	Zn
9.	*Bacillus subtilis,*	Bacteria/ species	Cu
10.	*Cyanadium caldarium*	Eukaryota, algae/species	Cu, Al
11.	*Cladosporium resinae*		Cu
12.	*Chlorella salina*	Agae/spieces	Co, Zn, Mn
13.	*Chlorella vulgaris*	Eukaryota, ,Viridiplantae/ species	Cu, Al
14.	*Citrobacter sp.*		Zn, Pb
15.	*Cladophora crispata*		Fe^{+2}, Cr^{+4})
16.	*Datura innoxia*	Eukaryota, Viridiplantae/ species	
17.	*Durvillaea potatorum*	Eukaryota/ species	Cu^{+2}, Cd^{+2}
18.	*Desulfovibrio vulgaris*	Basteria / species	U^{+6} toU^{+4}
19.	*Echerichia coli* *	Basteria / species	$Cr^{+6}$to Cr^{+3}
20.	*Ecklonia radiata*		Fe
21.	*Eichhornia crassipes*	Eukaryota, Viridiplantae/ species	As, Cd, Hg, Pb
22.	*Eterobacter cloacae*		Cr

BCU CLUJ-NAPOCA CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

23.	*Galdieria sulphuraria*	Eukaryota/ species	Cu
24.	*Ganoderma sp.*	Fungi/species	
25.	*Kluyveromyces marxianus*	Fungi/species	(U)
26.	*Lemna minor*	Viridiplantae/ species	$^{204+}$Tl, Cu, Mn, Hg, Na)
27.	*Leptospirillum ferrooxidans*	Bacteria/ species	
28.	*Mucor rouxii*	Fungi/species	
29.	*Mucor miehei*	Fungi/species	
30.	*Myrothecium verrucaria*	Fungi/species	
31.	*Phanerochaete chrysosporium*	Fungi/species	$Pb^{+2}Ni^{+2}$
32.	*Pseudomona aeruginosa*	Bacteria/ species	U, Cu^{+2}
33.	*Penicillium ochro-chlorom*	Fungi/species	
34.	*Penicillium funiculosum*	Fungi/species	
35.	*Penicillium chrysogenum*	Fungi/species	Pb, Zn
36.	*Penicillium italicum*	Fungi/species	
37.	*Pseudomonas cepacia* *	Bacteria/ species	
38.	*Rhizopus arrhizus* *	Fungi/species	$Sr^{+2}>Mn^{+2}>Zn^{+2}>Cd^{+2}>Cu^{+2}>Pb^{+2}$
39.	*Rhizopus nigricans**	Fungi/species	Fe

BCU "LUCIAN BLAGA" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

40.	*Sargassum fluitans*	Eukaryota/ species	$Pb^{+2} > Cd^{+2} > Cu^{+2} > Ni^{+2} > Zn^{+2}$
41.	*Sulfobacillus thermosufidooxidans*	Bacteria/species	
42.	*Sulfolobus*	Archae/ spieces	Mo, Cu, Fe
43.	*Sargassum*	Eukaryota/ genus	Pb, Cd, Cu, Zn, U, Cr
44.	*Sacharomyces cerevisiae**	Levuri/species	
45.	*Sphaerotilus natans**	Bacteria/ species	Cd, Zn, Cu, Ag, Cr),
46.	*Streptomyces longwoodensis**	Bacteria/ species	U , Fe
47.	*Streptoverticillium cinnamoneu*		Zn, Pb
48.	*Streptococcus faecalis**	Bacteria/ species	
49.	*Talaromyces ernersonii*		U
50.	*Thiothrix sp*	Bacteria/ genus	Cu, Ni, Zn,
51.	*Thiobacillus ferrooxidans**	Bacteria/ species	Zn
52.	*Zoogloea ramigera**	Bacteria/ species	

În tabelul 15 sunt prezentate şi câteva detalii referitoare la metodologia de izolare şi cultivare a unor microorganisme utilizate în procese de biosorbţie a metalelor grele.

BCU ASIO CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 15

Grupele fiziologice de bacterii acidofile folosite în biosolubilizare

Grupe fiziologice de bacterii	Medii selective folosite pentru izolare şi cultivare	pH-ul lichidelor de cultură
Bacterii heterotrofe acidofile	Mediul Golovacheva (pH =2,5)	1,0
	Mediul Brierley (pH= 2,0)	1,0
	Mediul Manning (pH=2,8)	2,5
Bacterii chemolitotrofe acidofile:		
Crescute pe Fe	Mediul 9K (pH=2,5)	1,5
Crescute pe S	Mediul Waksman (pH=4,0)	1,0
Crescute pe S_2O_3	Mediul Postgate (pH=5,0)	2,5
Alte bacterii fier si sulf oxidante	Mediul March (pH=2,5)	1,5

Procesul de biosolubilizare accelerată este posibil într-un interval de timp de aproximativ 7 zile. Ca inocul bacterian se preferă utilizarea unor culturi mixte (consorţii) de bacterii, scurtându-se astfel activitatea sinergică între componentele inoculului (Brierley, 1999).

Procentele de biosolubilizare a diferiţilor ioni metalici pot oscila între 6–58%, în mod preferenţial fiind solubilizaţi cu randamente superioare următorii ioni metalici: Zn, Pb, Ca, Mg, Cu, Mn (Babel, 1994).

Procesul de biosolubilizare poate avea loc şi în absenţa adaosului de inocul bacterian, dar în acest caz este necesar, pentru stimularea bacteriilor indigene prezente în sediment, administrarea de medii nutritive adecvate.

4.3. Asociații de microorganisme cu potențial de biodegradare a hidrocarburilor

4.3.1. Specii de microorganisme izolate din soluri contaminate cu reziduuri petroliere

În ultimii ani a sporit mult interesul în dezvoltarea "in situ" a unor tehnici pentru rezolvarea contaminărilor cu produse petroliere. Depoluarea biologică este una din tehnicile preferate, datorită costurilor scăzute pe care le implică şi condițiilor de lucru relativ sigure pentru mediul înconjurător. În principiu metoda constă în biodegradarea de către asociații de microorganisme (consorții) a produselor petroliere ce au contaminat diferite situs-uri. Microorganismele degradează aceşti poluanți organici utilizând propriile mecanisme enzimatice; produsele finale ale acestor procese de mineralizare aerobă a hidrocarburilor sunt biomasă microbială, bioxid de carbon şi apă (Atlas şi Bartha, 1993).

Studiile microbiologice dezvoltate au fost conduse astfel încât să stabilească rolul şi compoziția asociațiilor de microorganisme în timpul bioremedierii unor soluri contaminate cu deşeuri petroliere, într-un perimetru pilot, în condiții aerobe (Czechowice Oil Refinery – Polonia, 2000). **Comunitatea microbială** izolată din perimetrul unor rafinării constă în câteva tipuri de microorganisme cum sunt **levuri, fungi filamentoşi şi câteva bacterii** care sunt capabile să degradeze atât hidrocarburile liniare cât şi cele aromatice, la valori de pH foarte mici (2,5 sau chiar mai coborâte) (tabelul 16).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 16

Specii de microorganisme izolate din soluri contaminate cu reziduuri petroliere

Specia	Grup taxonomic
Chryseomonas chlororaphis	Bacterii
Chryseomonas luteola	Bacterii
Pseudomonas aureofaciens	Bacterii
Pseudomonas cepacia	Bacterii
Pseudomonas fluorescens	Bacterii
Pseudomonas mendocina	Bacterii
Pseudomonas sp.	Bacterii
Sphingomonas paucimobilis	Bacterii
Stenotrophomonas maltophilia	Bacterii
Aphanoascus reticulisporus	Fungi
Aphanoascus keratinophilum	Fungi
Candida famata	Fungi
Exophiala sp.	Fungi
Fusarium sp.	Fungi
Geomyces pannorum	Fungi
Geotrichum candidum	Fungi
Microsporum gypseum	Fungi
Penicillium sp.	Fungi
Phialophora sp.	Fungi
Phoma sp.	Fungi
Pseudallescheria boydii	Fungi
Scopulariopsis brevicaulis	Fungi
Trichophyton ajelloi	Fungi
Trichophyton terrestre	Fungi
Total: 25 specii cu 141 tulpini	

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Utilizarea acestor tipuri de microorganisme, folosite cel mai adesea în consorţii, reprezintă veriga cea mai importantă în tehnicile de bioremediere a solurilor contaminate cu produse petroliere (vezi cap. 5).

Subprodusele rezultate la prelucrarea petrolului şi care reprezintă importante surse de poluare a componentelor de mediu apă şi sol, pot fi valorificate prin obţinerea de biomasă microbiană. Aceasta din urmă poate fi utilizată ca substrat proteic.

4.3.2. Obţinerea de biomasă microbiană din petrol

Procedeele de obţinere a biomasei din petrol sunt de două tipuri: cele care folosesc ca substrat n-parafinele (alcani) şi cele care folosesc ca substrat motorina. Microorganismele utilizate în proces sunt **levuri** de tipul *Candida lipolitica* şi *Candida tropicalis.*

Procedee ce folosesc ca substrat n-parafine: din această categorie reprezentative sunt următoarele procedee:

- British Petroleum Grangeemontas – Scoţia;
- Esso-Nestle – S.U.A. si Elveţia;
- Kanegafuchi Chemical Industry Co Osaka – Japonia;
- Regional Research Laboratory – India;
- Inst. Francais du Petrol – Franţa;
- Inst. of Organo-Element Comp., Academy of Science – Rusia.

Procedeele diferă între ele, în special prin tipul de fermentator utilizat în linia tehnologică (Vogelbuch, Scholler-Seidfel, "air-lift", fermentatoare cilindrice cu agitare, fermentatoare tubulare), gradul de purificare al biomasei, nivelul de automatizare al procesului tehnologic (Dan, 1999).

Procesul tehnologic decurge aseptic. Schema tehnologică de obținere a biomasei din n-parafine este prezentată în figura 42 :

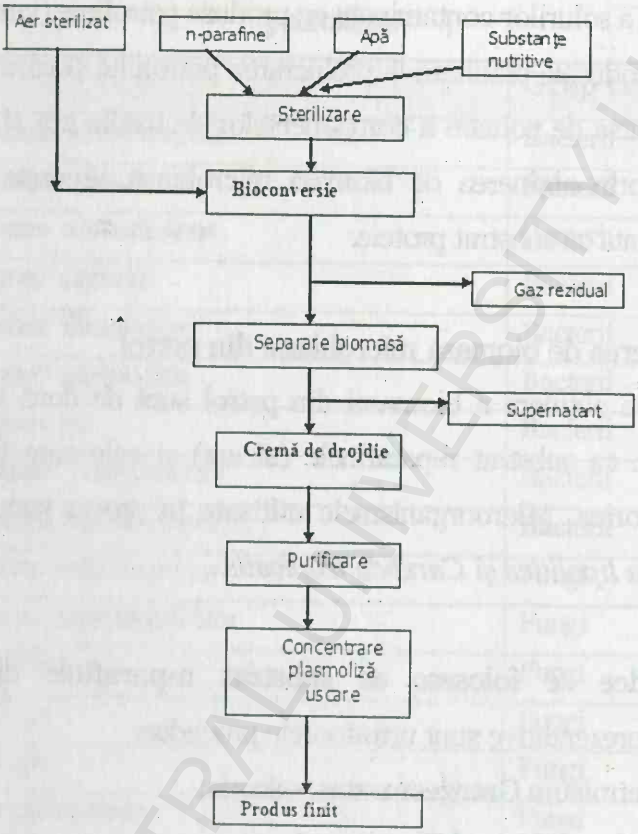


Fig. 42 Schema tehnologică de obținere a biomasei din n-parafine.

Procedee ce folosesc ca substrat motorina - din această categorie mai reprezentative sunt procedeele British Petroleum – Lavera Franța și procedeul rusesc. În aceste procedee **nu se realizează sterilizarea** substratului și aerului, dar există o secție de purificare a biomasei. Se folosesc de asemenea debite foarte mari de aer (oxigenul necesar

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

amestecării şi creşterii masei levuriene), iar barbotarea se face la viteze mari ale aerului (fig. 43).

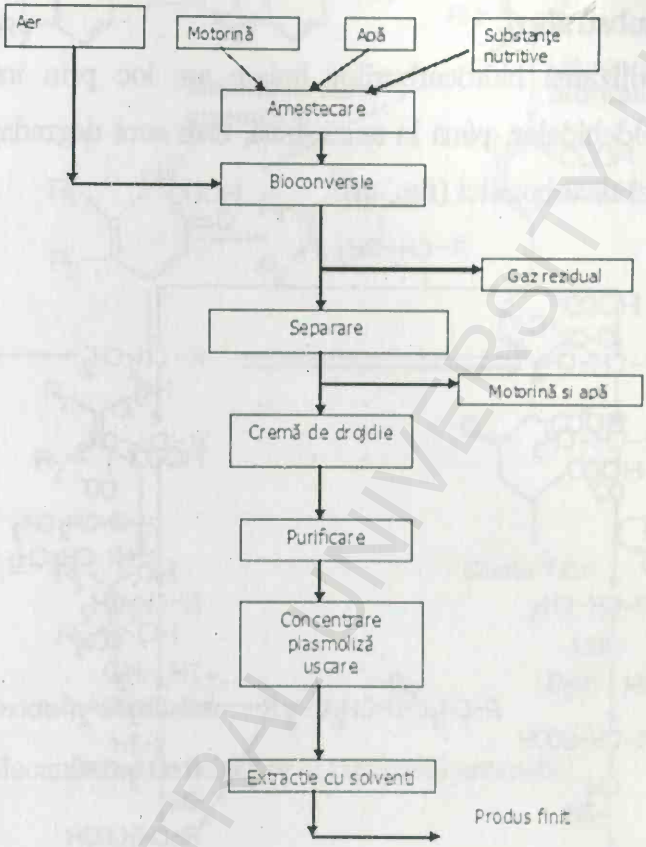


Fig. 43 Schema tehnologică de obţinere a biomasei din motorină

Analiza comparativă a celor două tipuri de procedee arată că producţia de biomasă se face cu **costuri apropiate**, diferenţele rezultând din ponderea componentelor în costurile respective (costurile materiilor prime este mai mare la procedeele cu substrat de n-parafine, în schimb costul sărurilor nutritive, al utilităţilor, manopera şi amortizările sunt mai mari la procedeele care folosesc ca substrat motorinele).

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Există **diferențe nete** între transportul hidrocarburilor din celula de levuri și cel al glucidelor, precum și **metabolizarea celor două categorii de substraturi.**

Metabolizarea hidrocarburilor liniare are loc prin intermediul alcoolilor și aldehidelor, până la acizi grași, care sunt degradați prin β-oxidare la acizi dicarboxilici (fig. 44).

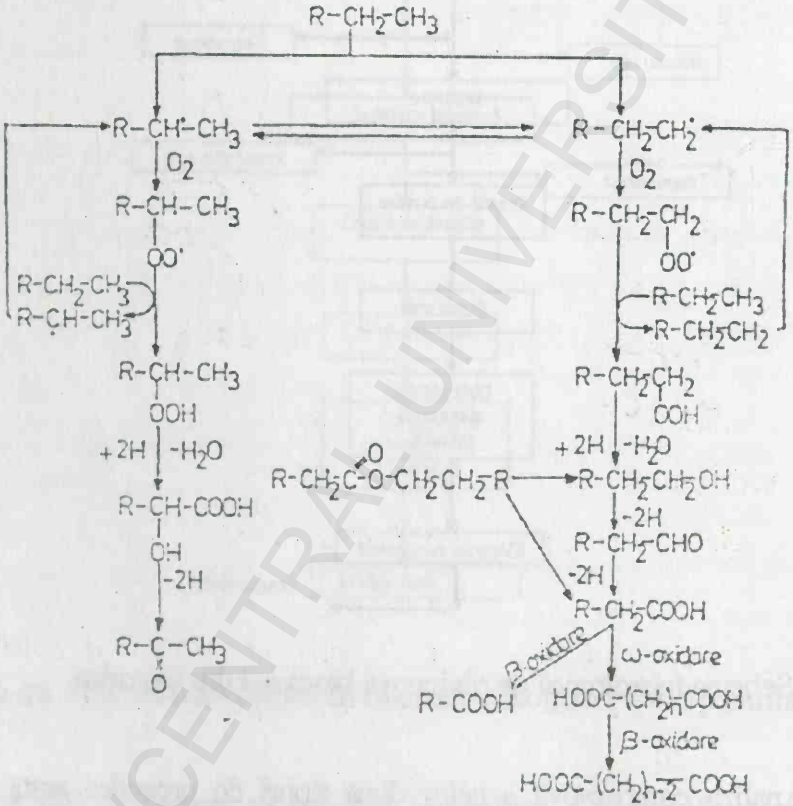


Fig. 44 Oxidarea parafinelor prin mecanismul reacțiilor înlănțuite

Mai complicată este metabolizarea hidrocarburilor aromatice până la α-cetoadipat, care este șuntat în ciclul acizilor tricarboxilici via acetil-CoA și succinat (fig. 45).

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

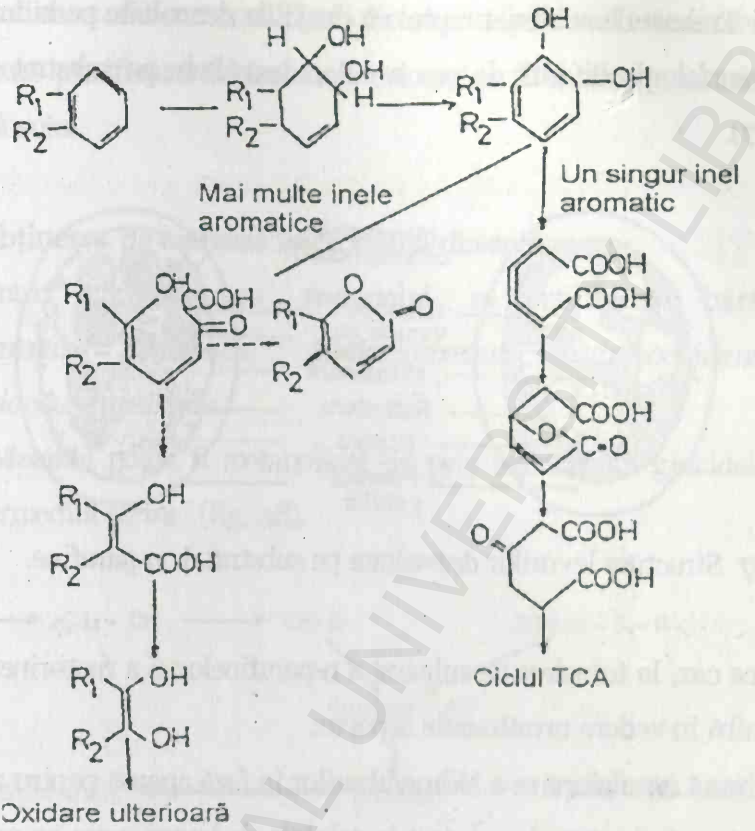


Fig. 45 Mecanismul de scindare al nucleului aromatic.

Cooxidarea joacă un rol important în transformarea hidrocarburilor aromatice în produși oxidați ce pot fi utilizați de către microorganisme (fig. 46).

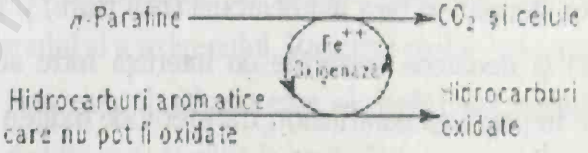


Fig. 46 Oxidarea n-parafinelor de către microorganisme.

Trebuie de subliniat faptul că drojdiile dezvoltate pe hidrocarburi au o morfologie diferită de cea a celor dezvoltate pe substrat glucidic (fig. 47).

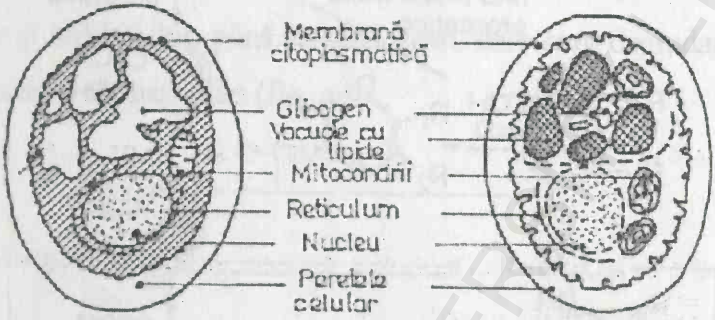


Fig. 47 Structura levurilor dezvoltate pe substrat de n-parafine.

În orice caz, la folosirea ca substrat a n-parafinelor şi a motorinei trebuie să se aibă în vedere următoarele aspecte:

- **o bună emulsionare** a hidrocarburilor în fază apoasă pentru a asigura un transfer optim de substrat la celulele de levuri, ceea ce presupune adaosul de agenţi tensioactivi şi sisteme de amestecare eficiente în fermentatoare;
- o **aerare corespunzătoare**, deoarece consumul de oxigen este de aproximativ 3 ori mai mare la transformarea hidrocarburilor decât la transformarea glucidelor. Acest lucru se explică prin solubilitatea diferită a oxigenului în faza hidrocarbură (mai mare) şi în faza apoasă (mai mică) şi deoarece condiţiile de interfaţă între aer şi apă sunt modificate în prezenţa parafinelor, transferul de oxigen la celulele de levuri fiind dificil;
- o menţinere a **pH-ului în limitele 4 – 6** cu amoniac şi a temperaturii în limitele 28... .31° C;

- o **eliminare eficientă a căldurii** din sistem (procesul este exotermic);
- o **bună purificare a biomasei**, oricare ar fi destinația ulterioară a produsului.

4.3.3. Obținerea de biomasă microbiană din metan

Pentru metabolizarea metanului se utilizează **bacteriile** *Pseudomonas methanica, Methanomonas methanooxidans și Metylocioccus capsulatis.*

Metanul poate fi metabolizat fie prin intermediul glucidelor fie prin intermediul serinei (fig. 48).

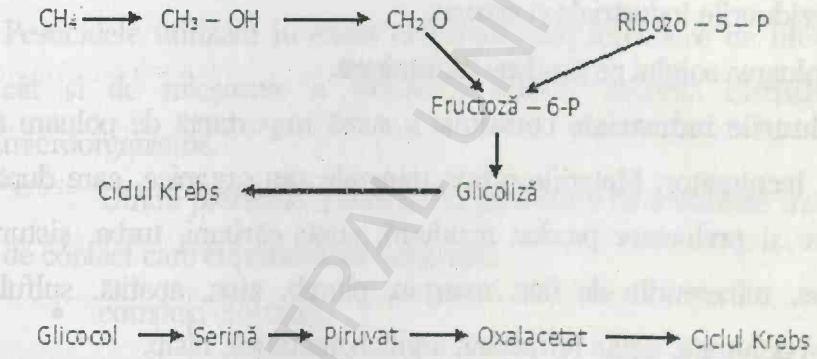


Fig. 48 Succesiunea de reacții în metabolizarea metanului

Se utilizează un fermentator cu agitare puternică pentru favorizarea dizolvării metanului și a oxigenului. Raportul molar oxigen/metan utilizat este 0,8/ 1,8. Procesul tehnologic care se desfășoară aseptic conduce la un randament de biomasă de până la 50 % față de masa metanului.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CAPITOLUL V

Biotehnologii de depoluare și remediere a solului

5.1. Surse de poluare a solului

Principalele surse de poluare a solului sunt:

- reziduurile industriale și urbane;
- poluarea solului cu produse fitosanitare.

A. Reziduurile industriale constituie o sursă importantă de poluare a mediului încojurător. Materiile prime minerale sau organice, care după exploatare și prelucrare produc reziduuri, sunt: cărbuni, turba, șisturi petrolifere, minereurile de fier, mangan, plumb, zinc, apatită, sulful, calcarul și dolomita, argila refractară, argila bentonitică, nisip.

În categoria poluanților solului sunt incluse și:

- materialele de decopertare, rămase după construcția conductelor magistrale de țiței și gaz metan;
- soluri rămase după îndepărtarea stratului lor superior, folosit în zone urbane pentru îmbunătățiri peisagistice;
- soluri folosite pentru copertarea haldelor de moloz și a rambleurilor de gunoi municipal;
- nămoluri portuare;

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- nămoluri din staţiile de epurare a apei (care conţin atât deşeuri industriale cât şi menajere);
- deşeuri radioactive:
- reactoarele de cercetare L.F.I.N. Măgurele;
- reactoare de testare a materialelor I.C.N. Piteşti;
- Centrala nucleară Cernavodă;
- Depozitul Naţional de îngropare pentru deşeuri radioactive, cu activitate joasă (Băiţa, Oraviţa);
- sterilul rezultat la procesarea uraniului (Feldioara).

B. Poluarea solului se poate datora **utilizării neraţionale a substanţelor fitosanitare**: erbicide, insecticide, fungicide, rodenticide şi nematocide. Pesticidele utilizate în exces determină atât fenomene de fitotoxicitate, cât şi de micşorare a fertilităţii solului, datorită distrugerii unor microorganisme.

Dintre pesticide, prezintă un grad mare de toxicitate insecticidele de contact care cuprind două subgrupe:

- compuşi clorurați;
- compusi organofosforici.

5.2. Microorganismele din sol ca participanţi în procesele de depoluare

Microorganismele îndeplinesc o serie de funcţii importante în transformarea substanţelor şi energiei în procesul de formare a solului, cum ar fi (Fletcher, 1994):

- transformarea substanţelor organice,

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- formarea diferitelor săruri simple din combinaţiile minerale şi organice,
- participă la descompunerea mineralelor din sol, la migrarea şi acumularea produşilor de pedogeneză.

De acţiunea microorganismelor sunt strâns legate desfăşurarea şi natura proceselor biochimice, nutritive, oxidoreducătoare, de aeraţie a solului, condiţiile de reacţie alcalino-acidă etc.

Microorganismele au un rol important în descompunerea substanţelor organice complexe din sol până la compuşi simpli finali: gaze (CO_2, amoniac etc.), apă şi combinaţii minerale simple.

Fiecărui tip de sol îi este proprie o distribuţie specifică de profil a microorganismelor şi compoziţia lor pe specii reflectă însuşirile mai importante ale solului, cum ar fi: rezerva de substanţă organică, cantitatea şi calitatea humusului, conţinutul de elemente nutritive, reacţia solului, asigurarea cu apă, gradul de aeraţie (Bucur şi Lixandru, 1997).

Biomasa ciupercilor şi bacteriilor în stratul arabil al solului reprezintă până la 5t/ha; numărul de bacterii ajunge la miliarde de celule la 1g de sol, iar lungimea hifelor de ciuperci este de până la 1000 m la 1g de sol (Babiova şi Zenova, 1983).

Rădăcinile plantelor, prin masă, lungimea şi procesele la care participă, exercită o mare influenţă asupra micropopulaţiilor din sol. Acestea absorb substanţele nutritive din sol, iar în anumite situaţii pot elibera în soluţia solului cationi sau anioni. De exemplu, s-a stabilit că cerealele păioase şi tutunul la sfârşitul perioadei de vegetaţie eliberează

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

potasiu în sol, iar soia, când solul nu conţine calciu, eliberează anioni fosfat.

Rădăcinile plantelor pot secreta diferite substanţe care influenţează fertilitatea solului. Astfel elimină CO_2 care favorizează transformarea substanţelor nutritive din fosfaţi, sulfaţi şi silicaţi, în forme accesibile plantelor. Acizii organici activi, de asemenea sporesc accesibilitatea pentru plantă a compuşilor minerali din sol. Secreţiile radiculare pot conţine ioni de potasiu, mangan, fier şi alte elemente, care influenţează în mare măsură activitatea microflorei din sol.

Rădăcinile pot secreta, mai ales în faza de încolţire a seminţei şi substanţe toxice care sunt vătămătoare pentru unele plante, aceasta fiind una din cauzele pentru care rădăcinile plantelor vecine nu se întrepătrund aşa de mult. Chimismul eliberării de substanţe toxice este puţin studiat. Se consideră că inul secretă acidul cianhidric care protejează plantele de atacul ciupercilor patogene, iar bobul şi mazărea secretă substanţe care omoară anumite specii de viermi.

Contactul strâns între sol şi rădăcini se datoreşte faptului că suprafaţa perilor radiculari este acoperită cu mucilagii de care se lipesc particule mici de sol. Perii radiculari şi o parte din rădăcinile fine funcţionează o perioadă scurtă de timp după care mor şi se desprind de rădăcinile vii. Ca urmare, microorganismele sunt aprovizionate în continuu cu substrat energetic uşor accesibil (Huang, 2002).

Influenţa reciprocă dintre plante şi microorganisme este prezentată schematic în figura 49.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

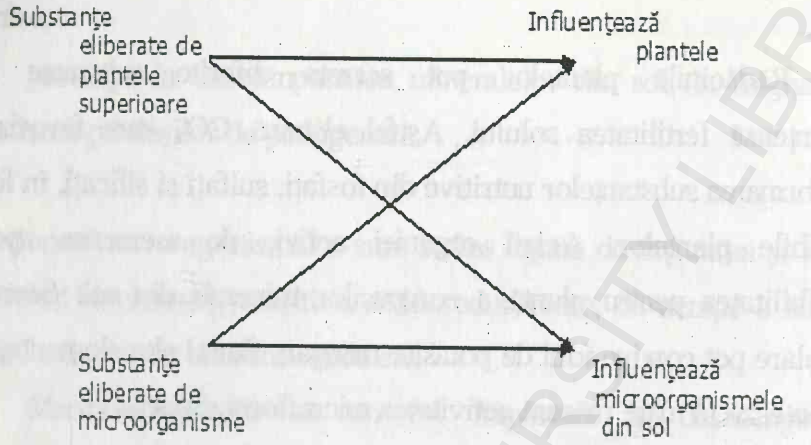


Fig. 49. Interacţiunile dintre plante şi microorganisme determinate de substanţele fiziologic active elaborate

5.2.1. Bacteriile din sol. Factori care condiţionează activitatea bacteriilor din sol

Bacteriile sunt printre cele mai mici şi mai numeroase microorganisme care trăiesc liber în sol. Astfel, participă la descompunerea substanţelor organice, la circuitul azotului, carbonului şi a altor elemente şi favorizează o parte din reacţiile chimice (organice şi anorganice) care au efecte importante asupra creşterii plantelor.

Numărul bacteriilor în sol variază foarte mult, cea mai redusă populaţie se găseşte în solurile nisipoase, pietroase, podzoluri, iar cea mai numeroasă în solurile fertile cum sunt cernoziomurile ş.a. în care, pentru perioade scurte se pot afla chiar până la 10 miliarde de indivizi la 1g de sol.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În mod normal populația bacteriană se află în peliculele de apă din sol.

După modul cum își procură energia necesară proceselor vitale, bacteriile se clasifică în două grupe: **heterotrofe și autotrofe.**

Bacteriile heterotrofe își obțin energia din descompunerea substanțelor organice complexe. Aici se încadrează majoritatea bacteriilor din sol. Unele dintre ele sunt fixatoare de azot, ca de exemplu, *Rhizobium sp.*(bacterie simbiotica), *Azotobacter chorococcum* (bacterie aerobă), *Clostridium pasteurianum* (bacterie anaerobă) ș.a.. Cea mai mare parte din bacteriile heterotrofe însă, pentru nutriție folosesc azotul fixat în alți compuși. Acestea sunt responsabile pentru descompunerea materiei organice.

Bacteriile autotrofe își obțin energia din oxidarea compușilor minerali simpli cu carbon sau a altor compuși anorganici. Acestea asimilează carbonul din dioxidul de carbon din aer, iar azotul și alte elemente, din compușii anorganici. În această grupă se încadrează bacteriile care oxidează amoniacul (*Nitrosomonas*), nitriți (*Nitrobacter*), sulful (*Thiobacillus thiooxidans*), fierul și compușii acestuia.

Cea mai importantă grupă o reprezintă aceea care oxidează amoniacul și nitriții și este cunoscută ca grupă de bacterii nitrificatoare. Acestea sunt autotrofe chimiosintetizante. Există în număr relativ redus și bacterii pigmentate care au o nutriție autotrofă fotosintetizantă.

Frecvența bacteriilor diferă foarte mult atât pe profil cât și în același orizont de sol. Cu puține excepții, numărul lor descrește cu adâncimea solului (tabelul 17) și reflectă distribuția materiei organice.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 17

Frecvenţa bacteriilor pe profil şi orizont de sol

Varianta	Adâncimea stratului de sol, cm	Bacterii totale, mil/g sol	Bacterii sporulate, mil/g sol	Ciuperci, mil/g sol	Actinomicete, mil/g sol	Microorganisme celulolitice, mil/g sol
Sol nelucrat	0 – 10	13.6	2.8	10.0	3.0	3.0
	20 – 30	1.6	1.6	1.0	0.5	0.0
	40 – 50	0.4	0.1	1.0	0.2	0.0
Sol lucrat	0 – 10	14.1	4.1	14.0	9.1	8.0
	20 – 30	8.2	1.8	23.0	5.5	4.0
	40 – 50	1.0	0.7	1.8	1.5	1.0

Distribuţia bacteriilor este influenţată mult şi de prezenţa rădăcinilor plantelor. Acestea, prin secreţiile pe care le produc sau prin părţile desprinse de pe învelişul scoarţei, ca urmare a reînnoirii permanente, servesc ca material energetic pentru microorganisme şi determină înmulţirea bacteriilor în apropiere (rizosfera).

Principalii factori care condiţionează activitatea bacteriilor din sol sunt:

- sursa accesibilă pentru energie;
- umiditatea solului;
- aerul;
- temperatura;
- reacţia solului;
- factorii biotici.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Lipsa de hrană sau de **sursă accesibilă** pentru energie este factorul limitativ principal. De aceea orice adaos de material energetic determină intensificarea activității bacteriilor. Activitataea bacteriilor poate fi limitată de insuficiența unuia sau mai multor elemente nutritive esențiale. Acest fenomen se constată mai ales în procesul de descompunere a hidraților de carbon sau a resturilor organice cu un raport mare C /N.

De aceea, adaosul de elemente nutritive minerale în procesul descompunerii (azot, fosfor, sulf, ș.a.) stimulează activitatea microbiologică. În procesul descompunerii substanțelor sărace în azot, cum sunt paiele, cocenii etc. (care conțin ~0.5%N) bacteriile își procură azotul din sol lipsind plantele de cultură în sezonul respectiv de acest element.

Activitatea bacteriilor se reduce odată cu **scăderea umidității**, astfel că la evaluarea corespunzătoare a coeficientului de ofilire, activitatea lor este slab perceptibilă. Majoritatea sunt rezistente la uscăciune astfel că, după umezire, fenomene ca nitrificarea, amonificarea, fixarea azotului pe cale nesimbiotică, oxidarea sulfului etc., se reiau rapid. Bacteriile mai sensibile la uscăciune sunt cele simbiotice, mai ales în cazul solurilor cu capacitate de tamponare redusă.

Pentru activitatea bacteriilor, sunt importante **concentrațiile în oxigen, CO_2 și azot** din aer. Oxigenul este necesar pentru procesele de oxidare, CO_2 ca sursă de carbon pentru organismele autotrofe și azotul pentru organismele fixatoare de azot.

Bacteriile aerobe cum sunt cele nitrificatoare, își desfășoară activitatea aproape cu aceeași intensitate când aerul din sol conține oxigen în proporții de 10-20% (volume). Activitatea lor se reduce considerabil la concentrații de oxigen mai mici de 10%. În ceea ce

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

priveşte CO_2, nitrificarea decurge rapid când acest gaz reprezintă 0.5-5% din volumul aerului.

Compoziţia aerului din sol este foarte variabilă şi ca urmare determină mari variaţii în dinamica microflorei solului. Deseori există o combinaţie complexă între microzone cu aerobioză şi unele cu anaerobioză. Acest fapt este demonstrat de prezenţa simultană a bacteriilor aerobe şi anaerobe în stratul de sol. Explicaţiile acestui fenomen pot fi multiple: de exemplu, bacteriile anaerobe proliferează în zonele în care cele aerobe au consumat oxigenul, sau în microzone izolate temporar (de către barierele de apă apărute în cazul precipitaţiilor excesive) etc.

Activitatea bacteriană se micşorează treptat cu **scăderea temperaturii**, încât aproape de 0^oC ea este foarte redusă.

În condiţii obişnuite, bacteriile îşi desfăşoară activitatea în intervalul de pH = 4–10, optimum fiind neutru-uşor alcalin. Dar cerinţele bacteriilor diferă astfel încât, pentru unele apare ca factor limitativ aciditatea, pentru altele alcalinitatea solului. **Aciditatea** mare împiedică activitatea bacteriilor simbiotice şi a celor nitrificatoare.

Majoritatea organismelor din sol exercită unele asupra altora un efect pronunţat. În unele situatii, **relaţiile biotice** pot fi favorabile, dar deseori activitatea unora stopează dezvoltarea altora sau le obligă să treacă în stare de viaţă latentă. Alteori activităţile lor se succed.

Una dintre cauzele coexistenţei mai multor specii de microorganisme în sol, poate fi specializarea pentru hrană. În acelaşi habitat pot coexista un număr mare de nişe ecologice. De exemplu, în rizosferă, unde abundă substanţele energetice (secreţii, exfolieri de pe

BCU MIRCEA CEL BĂTRÂN LIBRARY

scoarţa rădăcinilor etc.), mai multe specii de microorganisme acţionează simultan pe materiale diferite, ele nefiind deci în raporturi de concurenţă.

Un microhabitat este supus la schimbări în serie datorită fie fluctuaţiilor de condiţii fizice ale mediului, fie activităţii microorganismelor şi ca urmare prezintă o succesiune de nişe ecologice. Un exemplu evident de astfel de succesiune este ciclul de nitrificare: amoniacul este oxidat la nitriţi de către bacterii aparţinând genului *Nitrosomonas*, iar mai departe nitriţii sunt oxidaţi la nitraţi de către bacterii aparţinând genului *Nitrobacter*. Acesta este un exemplu tipic de inter relaţie, de asociaţie, de metabioză. Succesiuni mult mai complexe apar în procesul de descompunere a substanţelor organice ajunse în sol.

5.2.2. Actinomicetele şi ciupercile din sol

Actinomicetele, din punct de vedere morfologic, ocupă o poziţie între bacterii şi ciuperci. Se aseamănă cu ciupercile deoarece au miceliu ramificat, dar mai mult cu bacteriile: ca şi acestea sunt unicelulare, de mărimi apropiate, posedă nucleoizi, în compoziţia pereţilor celulari nu intră chitina sau celuloza etc. Actinomicetele se întâlnesc în diferite medii (apă, atmosferă, ţesuturile vii ale omului şi animalelor), dar în general sunt organisme care trăiesc în sol.

Unele actinomicete, cum sunt cele din familia streptomicete, produc substanţe aromatizante ca: acid acetic, acetaldehida, isobutanol şi izobutilacetat etc. care imprimă solului proaspăt arat un miros caracteristic.

Majoritatea actinomicetelor sunt aerobe, cu excepţia speciilor din genul *Actinomycoces*, care sunt anaerobe sau microaerofile şi care

BCU IASI CENTRALA UNIVERSITARA LIBRARY

constituie cauza actinomicozelor la om şi animale (Dunca şi Ailiesei, 2004).

Numărul actinomicetelor din sol variază între 10 şi 70% din numărul total de microorganisme şi se găsesc în colonii sub formă de masă de filamente. Aceste microorganisme sunt importante nu atât prin numărul lor, cât îndeosebi prin proprietăţile fiziologice deosebite. Sunt organisme heterotrofe şi desfăşoară o activitate însemnată în descompunerea celor mai variate substanţe organice din sol. Acţionează asupra substanţelor organice prin intermediul enzimelor pe care le produc: xilanaza pentru descompunerea hemicelulozelor, pectinaza pentru pectină, keratinaza pentru keratină, chitinaza pentru chitină s.a.

În procesul de descompunere de către microorganisme, deci şi de către actinomicete, compuşii cu carbon sunt parţial transformaţi în acizi humici. Primele procese în formarea acizilor humici sunt condiţionate de activitatea microorganismelor (Christman, 1995). Unele actinomicete cum sunt streptomicetele, dar mai ales *Nocardia*, folosesc acidul oxalic din resturile de plante ca sursă de carbon, îndeplinind astfel un rol important în detoxificarea solului.

Actinomicetele produc foarte multe vitamine, pigmenţi şi antibiotice. Astfel, vitamina B12 este produsă de *Streptomyces griseus; S. Olivaceus* şi *S. Aurefaciens*. Vitamine din complexul B ca thiamina şi riboflavina sunt biosintetizate de asemenea de unele actinomicete. Cantitatea de antibiotice formată în sol este mică şi foarte greu poate fi pusă în evidenţă. Cu toate acestea, antibioticele produse exercită un efect inhibitor local pentru multe ciuperci, precum şi asupra unor nematozi care sunt atraşi în jurul actinomicetelor de către produsele lor metabolice.

BCU IASI CENTRALA UNIVERSITARA LIBRARY

Ciupercile reprezintă microflora solului cu cele mai mari dimensiuni. Sunt organisme heterotrofe, fiind lipsite de clorofilă şi obligate să-şi obţină energia şi carbonul din substanţele organice complexe.

Ciupercile din sol sunt de diverse genuri, mai răspândite fiind: *Penicillium, Fusarium, Mucor, Aspergillus, Achyla, Martierella, Pythium, Chaetomium, Saprolegnia, Monosporium ş.a.* (Mirsal, 2004). Numărul de ciuperci variază de la câteva mii până la circa 1 milion/g sol, ceea ce echivalează cu aproximativ 800-1400 kg/ha, pe stratul arabil de 18 cm. Deşi mai puţin numeroase decât bacteriile, ciupercile formează o masă mai mare datorită faptului că miceliul lor este mult mai mai mare decât celula bacteriană.

Ciupercile din sol participă la descompunerea materiei organice de la substanţele uşor degradabile (de exemplu: zaharurile, amidonul, proteinele etc.) până la cele mai rezistente (de exemplu: celuloza, lignina, răşini). În procesul descompunerii, pe măsura modificării straturilor energetice şi deci a microhabitatelor, se succed şi grupele de ciuperci (ca de altfel şi celelalte microorganisme). Astfel, la început sporesc numeric ficomicetele (incluzând *Mucor* şi *Rhisopus*) care descompun mai ales amidonul şi zaharurile. Se înmulţesc apoi în ordinul *Penicillium* şi *Aspergillus, Cytofaga, Celvibrio, Cellfociculla,* concomitent cu pierderi de celuloză şi hemiceluloză, iar în final sporesc *Bazidiomicetele* care participă la descompunerea ligninei.

Ciupercile din sol pot fi **saprofite sau simbiotice.**

Ciupercile saprofite îşi procură energia din materia organică aflată în descompunere.

Ciupercile simbiotice trăiesc pe rădăcinele unor plante, arbori de pădure, pomi roditori. Această asociere ciupercă – rădăcini este numită micoriză şi de pe urma ei beneficiază atât plantele cât şi ciupercile. Fenomenul de convieţuire este foarte complex. În principiu, ciuperca foloseşte hidraţi de carbon asimilaţi de planta superioară, iar planta se aprovizionează cu azot în urma digerării miceliului ciupercii.

Multe dintre microorganisme produc substanţe antibiotice active asupra unor bacterii, ciuperci, plante superioare, iar altele produc substanţe toxice pentru diverse animale.

Ciupercile sunt microorganisme strict aerobe. Cea mai bună dezvoltare a ciupercilor are loc în medii cu reacţie neutră, dar suportă mai uşor decât alte microorganisme valorile scăzute de pH şi de aceea, în lipsă de concurenţă, se dezvoltă mai bine în solurile acide.

5.3. Mecanisme de biodegradare a poluanţilor solului

Poluanţii existenţi în sol sunt fie de natură organică, fie de natură anorganică. S-a constatat existenţa, atât în medii naturale cât şi în medii poluate, a peste 1600 de compuşi organici, de origine naturală sau antropică. Dintre aceştia, prezintă interes pentru poluarea solului şi subsolului produsele obţinute prin rafinarea petrolului, combustibilii, solvenţii organici clorurati sau necloruraţi, degresanţii, compuşii organici utilizaţi ca materii prime în diverse tehnologii. O clasificare simplificată a potenţialilor compuşi poluanţi este prezentată în figura 50 (Gavrilă, 2007).

BCU MIRCEA CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

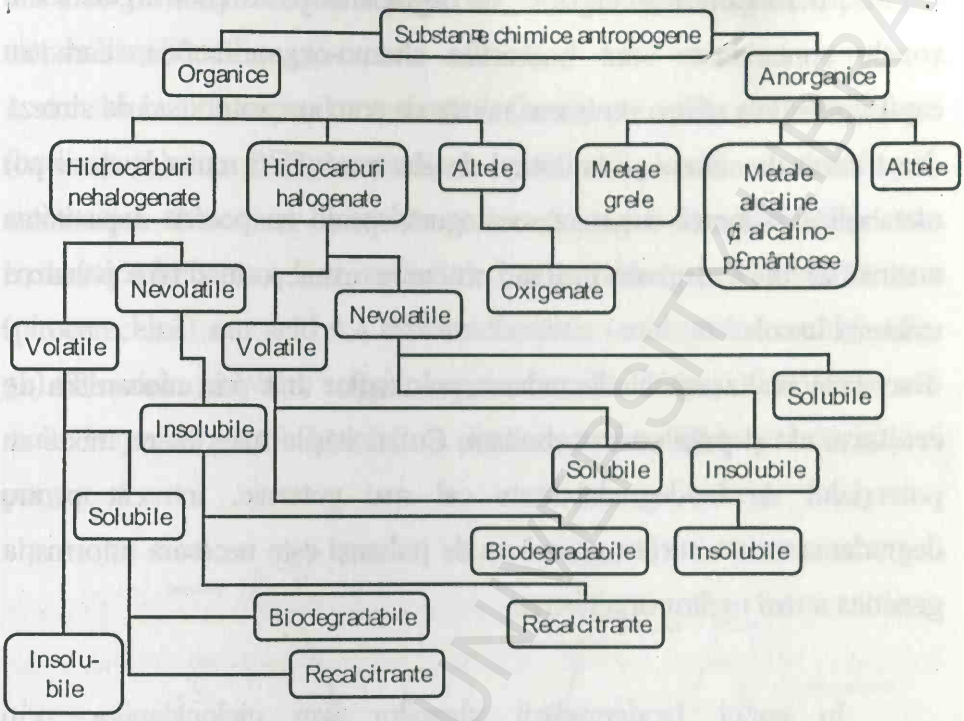


Fig. 50. Clasificarea simplificată a compușilor poluanți din sol

5.3.1. Degradarea aerobă a compușilor organici

Marea majoritate a compușilor organici naturali sau antropici se degradează în condiții aerobe, cu O_2 ca acceptor terminal de electroni. Atâta timp cât oxigenul este disponibil, acesta este acceptorul de electroni favorit al proceselor de degradare microbiană care au loc în natură.

Cele mai importante clase de poluanți organici sunt componentele țițeiului și produsele petrochimice halogenate. Acești compuși se degradează rapid și complet în condiții aerobe (Riser, 1998).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Microrganismele capabile de degradarea poluanţilor organici din zonele contaminate sunt **bacteriile chemo-organotrofice,** care au capacitatea de a utiliza un imens număr de compuşi naturali şi de sinteză drept sursă de carbon şi ca donori de electroni. Deşi multe bacterii pot metaboliza poluanţii organici, o singură specie nu posedă capacitatea enzimatică de a degrada toţi sau măcar o mare parte dintre poluanţii existenţi în sol.

Bacteriile realizează biodegradarea poluanţilor atât prin **mecanism de creştere, cât şi prin co-metabolism.** Comunităţile microbiene mixte au potenţialul de biodegradabilitate cel mai puternic, întrucât pentru degradarea amestecurilor complexe de poluanţi este necesară informaţia genetică a mai multor organisme.

In cazul biodegradării alcanilor sau cicloalcanilor prin **mecanismul de creştere,** într-o primă etapă are loc atacul oxigenului molecular asupra unei legături C–H printr-o reacţie catalizată de o monooxigenază sau dioxigenază, în funcţie de natura substratului şi de enzima posedată de microrganism. *n*-Alcanii cu catenă lungă (C_{10}–C_{24}) sunt rapid degradaţi până la acizi graşi care sunt metabolizaţi (vezi fig. 44). *n*-Alcanii cu catenă scurtă (C_5–C_9) sunt toxici pentru majoritatea microorganismelor, însă se evaporă rapid din solurile contaminate cu petrol (Köstner, 2000).

Cicloalcanii, aflaţi într-o proporţie mai redusă în ţiţei, sunt relativ rezistenţi la biodegradare. Absenţa unei grupări metilice îngreuiază atacul primar al oxigenului, pe când o catenă laterală facilitează biodegradarea. Intrucât sunt puţine microorganisme care pot utiliza cicloalcanii ca sursă

unică de carbon, cel mai adesea biodegradarea acestora are loc prin co-metabolism (vezi fig. 45).

In cazul compuşilor aromatici, fie că este vorba de hidrocarburi (benzen, toluen, etilbenzen, xileni, naftalină), fenoli şi clorofenoli, aminoacizi, chinone şi hidrochinone, aceştia pot fi transformaţi pe cale enzimatică în intermediari naturali de biodegradare: 1,2 dihidroxibenzen (pirocatechină) sau acid 3,4 dihidroxibenzoic (acid protocatechic), (fig. 51) (Trzesicka şi Ward, 1995). Aceştia sunt descompuşi ulterior, în mai multe etape, fie până la acetil-CoA şi succinat, fie până la acetaldehidă şi piruvat.

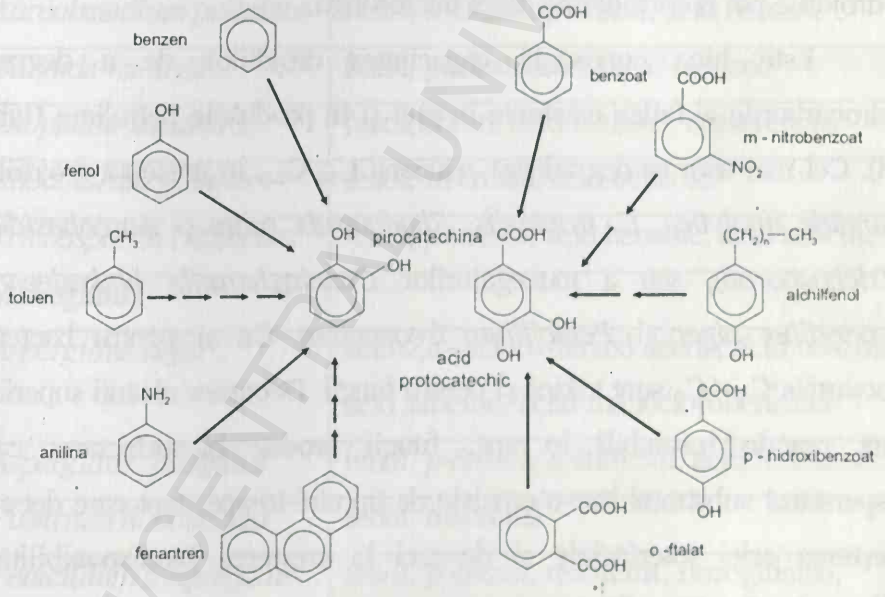


Fig. 51. Degradarea diverşilor compuşi aromatici naturali şi sintetici la pirocatechină şi acid protocatechic

In general benzenul şi derivaţii acestuia au o stabilitate termodinamică mai mare decât compuşii alifatici. Oxidarea benzenului

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

are loc prin hidroxilare catalizată de o dioxigenază. Diolul format se transformă apoi în pirocatechină. Hidroxilarea urmată de dehidrogenare se întâlnesc și n cazul biodegradării altor hidrocarburi aromatice, cum ar fi hidrocarburile aromatice policiclice (HAP) cu 3 și 4 cicluri. Existența unui substituent în nucleul benzenic permite fie atacul la catena laterală, fie oxidarea nucleului aromatic prin mecanisme alternative.

O altă categorie de organisme capabile să degradeze poluanții organici sunt **fungii**, existente în cele mai diverse medii (ape dulci, ape marine, sol, resturi de plante și animale, organisme vii etc.). Mucegaiurile și drojdiile pot fi considerate drept microfungii.

Este bine cunoscută capacitatea drojdiilor de a degrada hidrocarburile alifatice existente în țiței și în produsele petroliere (tabel 18). Cel mai ușor se degradează *n*-alcanii C_{10}-C_{24}, în prezența drojdiilor *Candida lipolytica*, *C. tropicalis*, *Rhodoturula rubra* și *Aureobasidion* (*Trichosporon*), sau a mucegaiurilor *Cunninghamella blakesleeana*, *Aspergillus niger* și *Penicillium frequentans*. Ca și pentru bacterii, fracțiunile $C_5 - C_9$ sunt toxice și pentru fungii. Deoarece alcanii superiori sunt practic insolubili în apă, fungii produc biosurfactanți care dispersează substratul într-o emulsie de tip ulei-în-apă, fapt care duce la creșterea ariei interfaciale și de aici la creșterea biodisponibilității hidrocarburilor (Gavrilă, 2007).

In microfungii, alcanii sunt oxidați enzimatic în prezența unei monooxigenaze până la alcoolii primari corespunzători:

$$R\text{–}CH_2\text{–}CH_3 + O_2 + NAD(P)H_2 \rightarrow R\text{–}CH_2\text{–}CH_2\text{–}OH + NAD(P) + H_2O$$

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Ulterior aceştia sunt oxidaţi la aldehide şi apoi la acizi graşi prin intermediul dehidrogenazelor legate de nucleotide piridinice. Acizii graşi produşi sunt întotdeauna metabolizaţi prin oxidare β ajungându-se în final la CO_2. Spre deosebire de bacterii, fungiile nu pot utiliza izoalcanii sau cicloalcanii ca sursă unică de carbon.

Tabelul 18

Specii de drojdii şi mucegaiuri care folosesc compuşii aromatici drept substrat de creştere

Specia	Substratul de creştere
Drojdii	
Aureobasidium pullulans	fenol, *o*-crezol, *p*-crezol, acid benzoic
Candida maltosa	fenol, pirocatechină, acid benzoic
Exophiala jeanselmei	fenol, stiren, acid benzoic, acetofenonă
Rhodotorula glutinis	fenol, *m*-crezol, acid benzoic
Trichosporon cutaneum	fenol, *p*-crezol, acid benzoic, acid salicilic
Mucegaiuri	
Aspergillus niger	acid 2,4-dicloro-fenoxi acetic, acid benzoic, acid salicilic, acizi monoclorobenzoici
Aspergillus fumigatus	fenol, *p*-crezol, 4-etilfenol, acid fenilacetic
Fusarium flocciferum	fenol, rezorcină
Penicillium frequentans	fenol, *p*-crezol, rezorcină, floroglucină, anisol, alcool benzilic, acid benzoic, acid salicilic, acid galic, acid fenilacetic, 1-feniletanol acetofenonă
Penicillium simplicissimum	fenol, floroglucină, monofluorofenoli

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Deşi unele drojdii şi mucegaiuri pot utiliza compuşii aromatici drept substrat de creştere, mult mai importantă este proprietatea acestora de a-i degrada prin co-metabolism. Enzimele de hidroxilare şi cele de rupere a inelului aromatic ale microfungilor sunt relativ nespecifice, ele transformând de regulă şi compuşi înrudiţi, inclusiv derivaţi halogenaţi şi nitroderivaţi. De asemenea, microfungii pot transforma co-metabolic numeroşi poluanţi aromatici, inclusiv hidrocarburi aromatice policiclice (HAP), bifenili, dibenzofurani, nitroaromatice, pesticide, plastifianţi. Transformările tipice sunt glicozilarea, hidroxilarea şi ruperea inelului aromatic, metoxilarea, reducerea grupelor nitro la grupe amino.

Este important de menţionat că şi *macrofungiile* (ciupercile) pot contribui la degradarea aerobă a poluanţilor organici. O parte dintre acestea, cele mai reprezentative fiind *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *Nematoloma frowardii*, *Agaricus bisporus*, *Agrocybe praecox*, *Stropharia coronilla*, au dezvoltat un sistem enzimatic eficient de degradare şi mineralizare a ligninei. Deşi la nivel de laborator, utilizarea macrofungiilor pentru biodegradarea anumitor poluanţi (HAP, TNT, policlorofenoli), ar fi posibilă, potenţialul competitiv redus al acestora în sol face ca utilizarea lor să fie încă restrânsă. Totuşi, s-au testat cu succes macrofungii ca *Stropharia rugosoannulata*, care se dezvoltă în porţiunile superioare ale solului şi în stratul de humus, pentru decontaminarea unor soluri poluate cu TNT sau HAP (Fritsche Hofrichter, 2005).

5.3.2. Degradarea anaerobă a compuşilor organici

Procesele de degradare anaerobă au fost considerate dintotdeauna mai puţin eficiente decât cele de degradare aerobă, mai ales din punct de

vedere cinetic. Bacteriile anaerobe obțin mult mai puțină energie prin conversia substratului decât cele aerobe, și în consecință produc mult mai puțină biomasă.

Degradarea materiei organice în absența oxigenului poate fi cuplată cu reducerea unor acceptori de electroni alternativi într-o ordine care depinde de valorile potențialelor redox ale sistemelor respective (tabelul 19). Reducerea acestor acceptori cu electroni proveniți din materia organică (potențialul redox mediu pentru transformarea globală: glucoză → $6CO_2$ este de –0,434 mV) va conduce la diferite cantități de energie, influențând astfel biochimismul biodegradării anaerobe (Schink, 2005).

Tabelul 19

Potențialul redox al sistemelor implicate în degradarea anaerobă a compușilor organici

Sistemul	Potențial redox, mV	Produs final
O_2/H_2O	+810 (la pH = 7)	H_2O
NO_3^-/NO_2^-	+430	NO_2^-, NH_3, N_2
MnO_2/Mn^{2+}	+400	$MnCO_3$
$FeOOH/Fe^{2+}$	+150	$FeCO_3$
SO_4^{2-}/HS^-	-218	S^{2-}
CO_2/CH_4	-244	CH_4

Cu toate dezavantajele degradării anaerobe, prezența oxigenului nu este întotdeauna avantajoasă în procesele de degradare. Oxigenazele introduc grupări hidroxil în nucleele aromatice; în continuare oxigenul poate conduce la formarea radicalilor fenolici care inițiază o polimerizare

şi policondensare necontrolată până la compuşi similari derivaţilor humici din sol, foarte dificil de degradat, fie aerob, fie anaerob.

Hidrocarburile alifatice saturate sunt relativ stabile în condiţii anaerobe. Bacteriile sulfat reducătoare şi cele nitrificatoare pot asimila hidrocarburi cu catenă lungă (C_{12}–C_{20}) sau medie (C_6–C_{16}), însă procesul decurge foarte lent.

Pentru degradarea anaerobă a compuşilor aromatici mononucleari sunt cunoscute cel puţin trei căi:

- prin benzoil-CoA (cea mai importantă), (figura 52);
- prin rezorcină;
- prin fluoroglucină.

In toate cele trei cazuri se formează într-o etapă reducătoare un compus 1,3 dioxo, care permite ulterior un atac nucleofil la unul dintre atomii de carboni cetonici ai nucleului, conducând la ruperea acestuia. µn funcţie de substratul aromatic, în final se ajunge fie la un rest pimelic (C_7 – dicarboxilic) legat de coenzima A, fie la un rest caproic (C_6 – monocarboxilic) parţial oxidat care prin oxidare β trece în acetat. Compuşii aromatici care nu posedă o grupare carboxilică (fenol, anilină etc.) sunt mai întâi carboxilaţi la un rest *p*-hidroxi sau *p*-amino benzoic, care ulterior este activat cu coenzima A (Doble şi colab., 2004).

Dintre compuşii nitroaromatici, ca poluant prezintă importanţă deosebită 2,4,6 trinitrotoluenul (TNT), prezent în solul amplasamentelor vechilor fabrici şi depozite de muniţii. Efectul de afinitate pentru electroni al grupelor nitro face dificilă degradarea oxidativă a acestui compus. Bacterii strict anaerobe cum sunt bacteriile reducătoare de sulfaţi transformă TNT în TAT (triaminotoluen), parţial utilizat ca sursă

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

de azot de către bacterii, restul probabil polimerizând în prezența urmelor de oxigen.

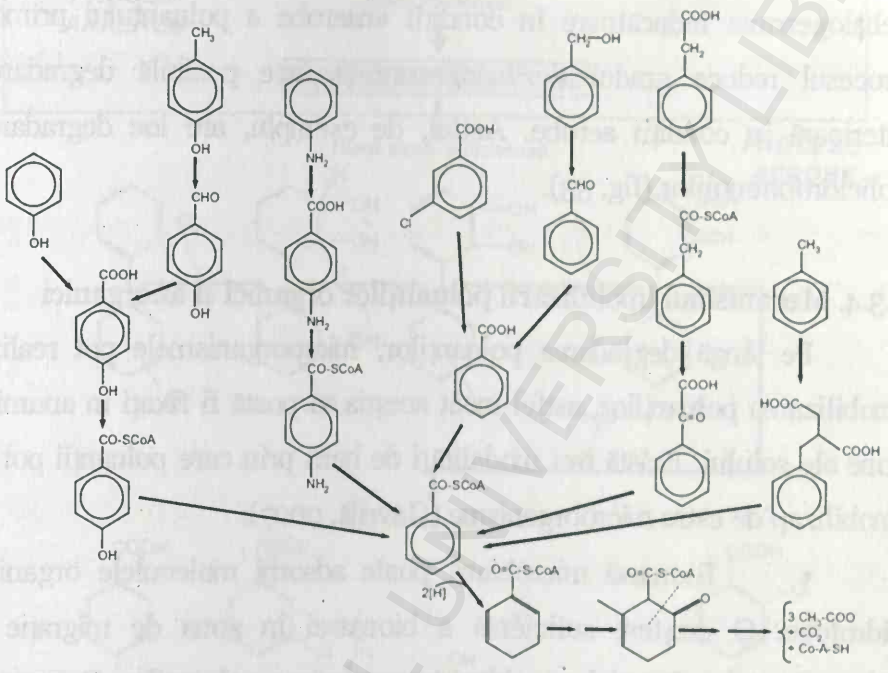


Fig. 52. Degradarea anaerobă a compușilor aromatici mononucleari prin benzoil-CoA

5.3.3. Degradarea mixtă a poluanților organici persistenți

Poluanții organici sunt cu atât mai recalcitranți cu cât gradul de halogenare este mai ridicat. Substituțiile la nucleul aromatic cu halogeni, grupări nitro sau sulfonice conduc la creșterea rezistenței sistemului la atacul electrofil prin oxigenază al bacteriilor aerobe. Dintre compușii rezistenți la aceste atacuri fac parte și policloro- bifenolii (PCB), dioxinele clorurate, unele pesticide (DDT, lindan) (Evans și Furlog, 2003).

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

In cazul acestor poluanţi, degradarea se face prin cooperarea între bacteriile aerobe şi cele anaerobe. Intr-o primă etapă are loc dehalogenarea reducătoare în condiţii anaerobe a poluantului primar. Procesul reduce gradul de halogenare şi face posibilă degradarea ulterioară în condiţii aerobe. Astfel, de exemplu, are loc degradarea policlorobifenolilor (fig. 53).

5.3.4. Mecanismul imobilizării poluanţilor organici şi anorganici

Pe lângă degradarea poluanţilor, microorganismele pot realiza imobilizarea poluanţilor, astfel încât aceştia să poată fi fixaţi în anumite zone ale solului. Există trei modalităţi de bază prin care poluanţii pot fi imobilizaţi de către microorganisme (Gavrilă, 2007):

- Biomasa microbiană poate adsorbi moleculele organice hidrofobe. O creştere suficientă a biomasei în zona de migraţie a poluanţilor poate încetini sau chiar stopa mişcarea poluanţilor. Conceptul poartă denumirea de *biocortină*.
- Microorganismele pot produce specii reduse sau oxidate care provoacă precipitarea metalelor. De exemplu, oxidarea Fe^{2+} la Fe^{3+} conduce la precipitarea celui din urmă sub formă de $Fe(OH)_3$ solid; reducerea ionilor SO_4^{2-} la sulfuri (S^{2-}) provoacă precipitarea Fe^{2+} sau Hg^{2+} ca sulfuri; reducerea Cr^{6+} solubil şi toxic la Cr^{3+} conduce la precipitarea acestuia din urmă ca oxid, sulfură sau fosfat; reducerea uraniului solubil U^{6+} la U^{4+} care precipită sub formă de UO_2.
- Microorganismele pot biodegrada compuşii organo-metalici solubili, astfel încât metalul din complex să precipite şi să fie imobilizat.

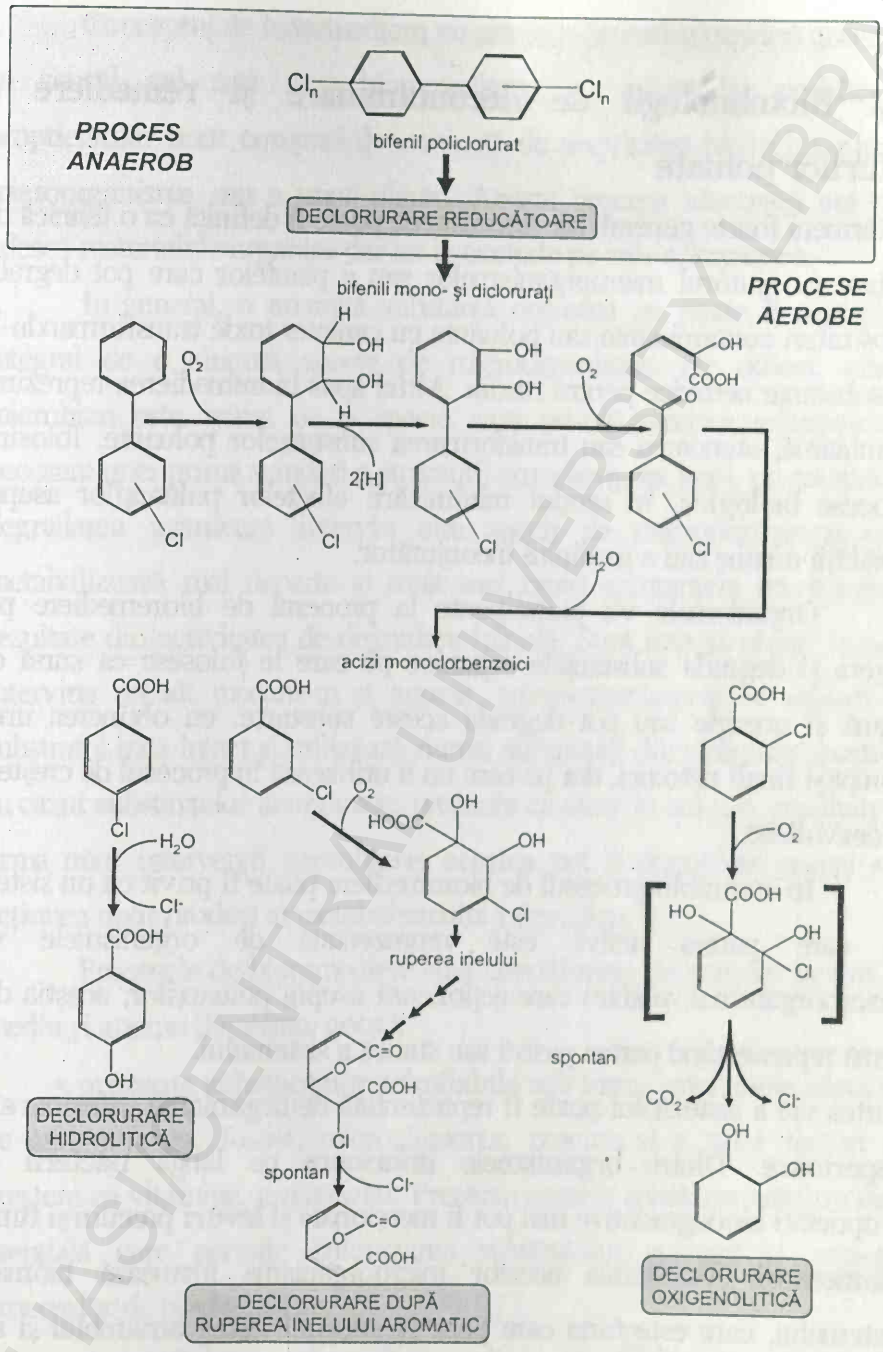


Fig. 53. Degradarea policlorobifenolilor printr-o secvență de procese anaerobe şi aerobe (după Gavrilă, 2007)

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

5.4. Biotehnologii de decontaminare şi remediere a solurilor poluate

In termeni foarte generali **bioremedierea** poate fi definită ca o tehnică de tratare cu ajutorul microorganismelor sau a plantelor care pot degrada substraturi contaminante sau poluante cu caracter toxic transformandu-le în substanţe netoxice pentru mediu. Altfel spus bioremedierea reprezintă eliminarea, atenuarea sau transformarea substanţelor poluante, folosind procese biologice, în scopul minimizării efectelor poluanţilor asupra sănătăţii umane sau a mediului înconjurător.

Organismele vii participante la procesul de bioremediere pot îngera şi degrada substanţele organice pe care le folosesc ca sursă de hrană şi energie sau pot degrada aceste substanţe, cu obţinerea unor compuşi finali netoxici, dar pe care nu îi utilizează în procesul de creştere şi dezvoltare.

In ansamblu procesul de bioremediere poate fi privit ca un sistem în care partea activă este reprezentată de organismele vii (microorganisme, plante) care acţionează asupra poluanţilor, aceştia din urmă reprezentând partea pasivă sau statică a sistemului.

Partea vie a sistemului poate fi reprezentată de **organisme inferioare** şi **superioare**. Dintre **organismele inferioare** pe lângă **bacterii** cu proprietăţi biodegradative mai pot fi menţionate şi **levuri** precum şi **fungi filamentoşi**. Totalitatea acestor microorganisme formează biomasa sistemului, care este forţa care pune în mişcare întreg ansamblul şi are caracter dinamic. In categoria organismelor superioare intră plantele leguminoase, cereale, arbori şi arbuşti, plante de apă, etc.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Conceptul de bioremediere nu are încă un cadru unanim acceptat. In sensul cel mai larg bioremedierea se referă la modificarea proprietăților unor compuși determinată de activitatea biologică a unor microorganisme sau a unor plante. Aceste procese afectează cel mai adesea materialele organice dar nu le exclude pe cele anorganice.

In general, o anumită substanță organică nu poate fi degradată integral de o singură specie de microorganisme. De obicei, atacul microbian este inițiat de o specie care posedă enzime extracelulare necesare unei prime scindări a structurii complexe, iar apoi, pe măsură ce degradarea avansează intervin alte specii de microorganisme care metabolizează mai departe și mult mai rapid substanțele intermediare rezultate din activitatea de degradare inițială. Sunt însă și cazuri în care intervine un alt mecanism și anume, microorganismele se adsorb pe substratul încă intact și utilizează numai subunități din structura acestuia. In cazul substanțelor anorganice, prezente ca atare în sol sau rezultate în urma unor intervenții microbiene, acestea pot fi degradate numai sub acțiunea unor produși ai metabolismului microbian.

Procesele de bioremediere sunt condiționate de anumiți factori de mediu și anume (Diaconu, 2005):

• **prezența substanțelor asimilabile** sub forma unor surse adecvate de carbon, azot, fosfor, microelemente, precum și a unor factori de creștere ca vitamine, aminoacizi. Prezența acestor substanțe este condiția esențială care permite colonizarea substratului poluant și inițierea proceselor de biodegradare;

• **starea fizică a poluanților** – substanțele dizolvate sunt mai ușor accesibile populației microbiene decât cele aflate în suspensie iar acestea

BCU "MIRCEA CEL BĂTRÂN" UNIVERSITY LIBRARY

din urmă mai uşor biodegradate decât cele solide. In general, poluanţii solizi sunt biodegradaţi de către microfungi deoarece aceştia au capacitatea de a pătrunde în substrat şi de a transloca nutrienţii de-a lungul hifelor;

• **umiditatea** are o importanţă majoră deoarece toate microorganismele au nevoie de o peliculă de apă în jurul celulei, care îi asigură posibilitatea de a creşte şi de a intra în competiţie cu alte celule;

• **temperatura** este un parametru important deoarece pe de o parte asigură creşterea microorganismelor (cu temperatură optimă de dezvoltare în intervalul 25-30° C), iar pe de altă parte are un rol important în îndepărtarea compuşilor volatili.

Dar **cel mai important factor în procesele de biodegradare îl reprezintă componenta vie, microorganisme şi plante.** Microorganismele implicate în aceste procese trebuie să îndeplinească anumite condiţii:

• să degradeze intens şi rapid o gamă cat mai mare de compuşi;

• să se reproducă uşor atât în medii naturale cât şi în cele artificiale;

• să fie stabile şi să poată fi uşor conservate şi reactivate fără a suferi modificări esenţiale;

• să poată fi utilizate în asociaţii cu alte microorganisme active fără a intra în competiţie.

Tehnologii de decontaminare şi remediere a solurilor poluate

In cazul locaţiilor contaminate cu poluanţi sunt aplicate fie **proceduri de securizare,** fie **proceduri de remediere.** In timp ce **remedierea asigură distrugerea sau reducerea cantitativă şi calitativă a poluanţilor,**

BCU RSIC CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

securizarea are drept scop ridicarea de bariere pentru împiedicarea împrăştierii poluanţilor pe arii mai largi. Deoarece sursa de poluare rămâne, iar barierele ridicate sunt supuse degradării şi îmbătrânirii, securizarea este doar o măsură temporară, tot remedierea rămânând procedura de aplicat.

Metodele de remediere se pot **clasifica** astfel:

- **în funcţie de locul de aplicare** al acestora deosebim procese *ex situ* şi *in situ.* Procesele *ex situ* necesită excavarea solului contaminat urmată de tratarea acestuia fie pe loc (remediere *on-site*), fie într-o instalaţie externă de tratarea solului (remediere *off-site*). Tratamentul *in situ* se realizează fără a fi necesară excavarea solului, direct în situl contaminat.
- **în funcţie de tipul proceselor implicate** deosebim procese **termice, fizico-chimice şi biologice.**

Procesele termice de remediere se bazează pe transferul poluanţilor din matricea solului în faza gazoasă prin aport de energie termică. Poluanţii sunt eliberaţi din sol prin vaporizare şi apoi sunt incineraţi, gazele reziduale fiind ulterior purificate.

Procesele fizico-chimice sunt, în general **procese de spălare umedă şi/sau de extracţie.**

Principiul procedeelor de spălare *ex-situ* a solurilor constă în concentrarea poluanţilor într-o fracţiune reziduală cât mai redusă, apa fiind agentul de extracţie cel mai frecvent utilizat. Pentru transferul contaminanţilor din sol către extractant, două mecanisme sunt importante:

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- crearea unor forţe de forfecare puternice, induse prin pompare, amestecare, vibrare sau prin utilizarea unor jeturi de apă de înaltă presiune, care să rupă aglomeraţiile de particule poluate şi nepoluate şi să disperseze contaminanţii în faza de extracţie;
- dizolvarea contaminanţilor de către componenţii fazei extractant.

Extracţia *in situ* constă în percolarea unui agent extractant apos prin solul contaminat. Percolarea se poate realiza prin şanţuri de suprafaţă, drenuri orizontale sau puţuri verticale de adâncime. Contaminanţii solubili din sol se dizolvă în lichidul percolant care este pompat şi tratat ulterior la faţa locului.

Procesele biologice se bazează pe acţiunea microorganismelor care au capacitatea de a transforma poluanţii organici în principal în CO_2, apă şi biomasă, sau de a imobiliza poluanţii prin legare în fracţiunea humică a solului. Degradarea se realizează, de regulă, în condiţii aerobe sau, mai rar în condiţii anaerobe. Pentru eficientizarea procesului este esenţială optimizarea condiţiilor de dezvoltare a microorganismelor (aport de oxigen, pH, conţinut de apă etc.). Stimularea activităţii biologice se poate realiza prin omogenizarea solului, aerare activă, umidificare sau uscare, încălzire, adăugare de nutrienţi sau substraturi, inoculare cu microorganisme. Procesele biologice necesită un aport de energie mult mai redus decât cele termice sau fizico-chimice, dar necesită perioade de tratare mai îndelungate.

Tratamentele biologice *in situ* includ:

- atenuarea naturală monitorizată;
- bioremedierea îmbunătăţită sau bioaugmentarea;

BCU MARIN PREDA UNIVERSITY LIBRARY

- bioaerarea (bioventling și cazuri particulare de biosparging și bioslurping);
- fitoremedierea.

Tratamentele biologice *ex situ* includ:

- bioremedierea în fază de nămol (în bioreactoare);
- bioremedierea în fază solidă (biodegradarea în vrac):
  - bioremedierea în movile statice sau biopilele;
  - compostarea;
  - biodegradarea în straturi preparate sau landfarming.

5.4.1. Tratamentele biologice *in situ*

Atenuarea naturală se bazează pe procese naturale de decontaminare sau atenuare a poluării în sol și ape subterane. In mod natural, în subsol pot avea loc următoarele procese prin care concentrația poluanților s-ar putea diminua sub limita admisibilă: diluția, volatilizarea, adsorbția, transformarea chimică și biodegradarea. Deși atenuarea naturală decurge în majoritatea siturilor poluate, este necesară existența unor condiții corespunzătoare pentru depoluare, altfel aceasta va fi incompletă sau insuficient de rapidă. Este necesară testarea sau monitorizarea acestor condiții pentru a verifica fezabilitatea atenuării naturale. Metoda se pretează cel mai bine pentru utilizare în zonele în care sursa de poluare a fost îndepărtată (Gavrilă, 2007).

Atenuarea naturală monitorizată nu este sinonimă cu „neluarea nici unei măsuri", deși aceasta este percepția cea mai frecventă. In comparație cu alte tehnologii de remediere, tehnica prezintă o serie de **avantaje** ca:

BCU MSC CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- generarea sau transferul redus de deşeuri;
- impactul redus asupra siturilor (nu se intervine cu structuri construite);
- aplicabilitate totală sau parţială într-un anumit sit, în funcţie de condiţiile concrete şi de obiectivul remedierii;
- posibilitatea utilizării împreună sau după alte măsuri active de remediere;
- costuri globale mai reduse decât în cazul remedierii active.

Poluanţii susceptibili la eliminare prin atenuarea naturală monitorizată sunt **compuşii organici volatili şi semivolatili** (COV, COSV) precum şi **hidrocarburile existente în combustibili**, anumite categorii de **pesticide, precum şi unele metale grele** (Cr, de ex.) dacă există condiţii de imobilizare a acestora prin modificarea stării de oxidare.

Printre **dezavantajele** procedeului pot fi menţionate:

- posibilitatea ca produşii intermediari de degradare sa fie mai mobili sau mai toxici decât contaminantul iniţial;
- posibilitatea migrării contaminanţilor înaintea degradării lor;
- posibilitatea imobilizării unor poluanţi (Hg, de ex.) fără a putea realiza degradarea lor;
- monitorizarea pe termen lung, cu costurile aferente;
- durata mai mare comparativ cu măsurile active de remediere;
- posibilitatea modificării în timp a condiţiilor hidrologice şi geochimice, care ar putea duce la refacerea mobilităţii poluanţilor în prealabil imobilizaţi;

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- reticența opiniei publice la astfel de măsuri „pasive" de depoluare.

Bioaugmentarea sau bioremedierea îmbunătățită

Bioremedierea implică în mod frecvent adăugarea microorganismelor indigene sau exogene sitului contaminat. Doi factori limitează utilizarea bioaugmentării:

- culturile nonindigene concurează rar suficient de bine cu o populație indigenă pentru a dezvolta și susține concentrații corespunzătoare ale populației microbiene ;
- majoritatea solurilor expuse pe o lungă durată de timp la poluanți biodegradabili au microorganisme indigene care sunt capabile de o degradare eficientă (dacă unitatea de tratament a solului este bine organizată).

Bioaugmentarea este un proces în care microorganisme indigene sau inoculate (bacterii, fungii etc.) metabolizează poluanții organici din sol sau ape subterane, cu formare de produși stabili, nepoluanți. Pentru îmbunătățirea procesului, sau pentru desorbția poluanților din materialele subterane se pot adăuga nutrienți, oxigen, alte amendamente.

Uneori microorganismele din situl supus remedierii sunt colectate, cultivate separat și apoi reintroduse în sit ca mijloc de mărire rapidă a populației microbiene în situl respectiv. Alteori, deși mai rar, se pot adăuga alte tipuri de microorganisme în diferite etape ale procesului de remediere, ca urmare a modificării compoziției poluanților pe măsură ce procesul de bioremediere evoluează.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

In cazul în care degradarea poluanţilor este un proces aerob, bioremedierea îmbunătăţită se poate realiza prin percolarea sau injectarea în sol de apă freatică sau apă necontaminată cu conţinut de nutrienţi şi saturată cu oxigen dizolvat. In locul oxigenului dizolvat se poate folosi o altă sursă de oxigen, de ex. H_2O_2. In cazul solurilor contaminate în stratul superficial, puţurile de injecţie sunt înlocuite cu galerii de infiltraţie sau cu sisteme de irigare la suprafaţă. Deoarece temperaturile scăzute încetinesc bioremedierea, solul poate fi acoperit cu diverse dispozitive de încălzire sau menţinere a temperaturii, pentru accelerarea procesului.

Dacă prin degradare anaerobă rezultă intermediari sau produşi mai periculoşi decât poluanţii iniţiali (ex.: degradarea anaerobă a tricloretenei la clorură de vinil), se recomandă crearea ulterioară de condiţii aerobe pentru neutralizarea acestora.

Bioremedierea îmbunătăţită a fost aplicată cu succes pentru remedierea solurilor, nămolurilor şi apelor subterane contaminate cu **hidrocarburi din petrol, solvenţi, pesticide, conservanţi pentru lemn, alte substanţe organice.**

Această tehnică prezintă şi o serie de limitări:

- ineficienţa în cazul în care matricea solului nu permite contactul între poluanţi şi microorganisme;
- circulaţia soluţiilor apoase prin sol poate conduce la creşterea mobilităţii poluanţilor;
- colonizarea preferenţială a microorganismelor poate produce înfundarea puţurilor de injecţie a apei/nutrienţilor;

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- curgerile preferențiale pot reduce considerabil contactul fluidelor injectate cu poluanții – procesul nu este recomandat pentru solurile argiloase, puternic stratificate sau eterogene;
- concentrații ridicate de metale grele, compuși cu grad ridicat de clorurare, alcani cu catenă lungă, săruri anorganice sunt toxice pentru microorganisme;
- scăderea vitezei procesului la scăderea temperaturii.

Bioaugmentare poate fi considerată o tehnologie pe termen lung, depoluarea unui sit putând dura între 6 luni și 5 ani, în funcție și de specificul local. Costurile aferente tehnologiei variază între 30–100 USD/m^3 de sol tratat.

Bioaerarea

Bioaerarea este un procedeu prin care biodegradarea aerobă *in situ* este stimulată prin aport suplimentar de oxigen către bacteriile solului. Spre deosebire de procedeul de extracție a vaporilor din sol, bioaerarea utilizează debite scăzute de aer, atât cât să susțină activitatea microbiologică. Uzual oxigenul este adăugat în sol prin injecție directă de aer în situl contaminat. Injectarea de aer se poate realiza în puțuri verticale sau în canale orizontale (fig. 54).

Pe lângă accelerarea degradării, bioaerarea are și un efect secundar, acela de a deplasa poluanții volatili prin solul activat. Procedeul se aplică, de regulă, în zona nesaturată a solului (zona vadoasă) și se pretează tuturor compușilor care pot fi biodegradați aerob (Leeson și Hinchee, 1996).

BCU MASTER CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

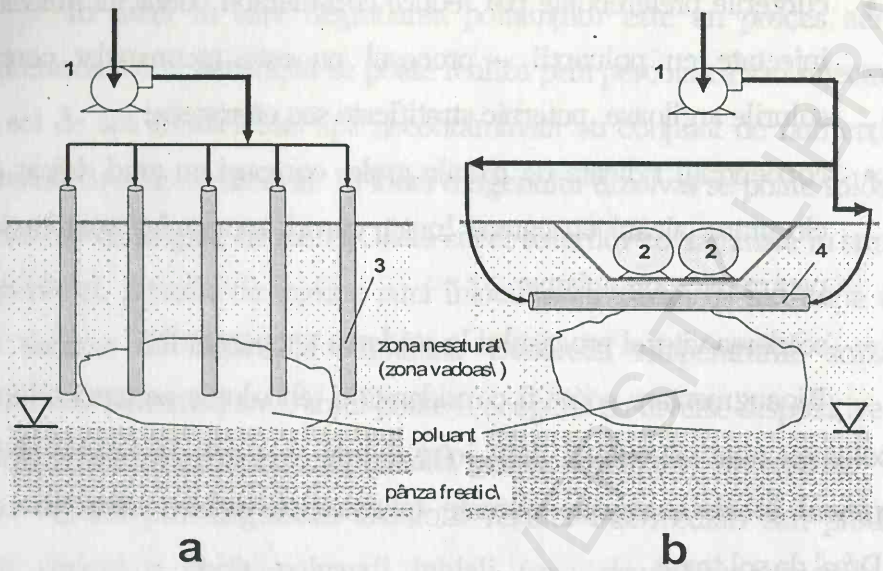


Fig. 54. Schema de principiu a bioaerării (după Gavrilă, 2007): a – injecție verticală; b – injecție orizontală; 1 – compresor; 2 – rezervor de combustibil (sursă de poluare); 3 - puțuri verticale; 4 – conducte orizontale de injecție

Principalii factori care limitează bioaerarea sunt:

- condiții hidrogeologice improprii (pânza freatică foarte apropiată de suprafață, lentile de sol saturat, permeabilitate redusă a solului);
- umiditatea extrem de scăzută a solului (la sub 2% masice umiditate, activitatea microbiană este inhibată);
- umiditatea prea ridicată a solului (reduce permeabilitatea aerului şi scade rata de transfer a oxigenului);
- temperaturile scăzute.

Pe lângă schema tehnologică tipică redată în fig. 54, există şi alte posibilități tehnice de a realiza bioaerarea: în circuit închis, sau prin deshidratare sub presiune (fig. 55). In cazul aplicării circuitului închis se

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

maximizează cantitatea de poluant biodegradată, prin recircularea oxigenului care nu este consumat în totalitate la o singură trecere. Solul din zona vadoasă devine un bioreactor cu recircularea fazei gazoase, în care doar 10% din debitul de aer recirculat trebuie înlocuit cu aer proaspăt. In cazul deshidratării sub presiune, aerul este injectat sub presiune chiar deasupra nivelului pânzei freatice. In zona respectivă are loc deshidratarea solului, pânza freatică se deformează, iar zona contaminată este expusă acţiunii oxigenului din aer. Se accelerează astfel degradarea poluanţilor din capilare, îmbunătăţindu-se totodată calitatea apei subterane, fără a mai fi necesară remedierea directă a acesteia.

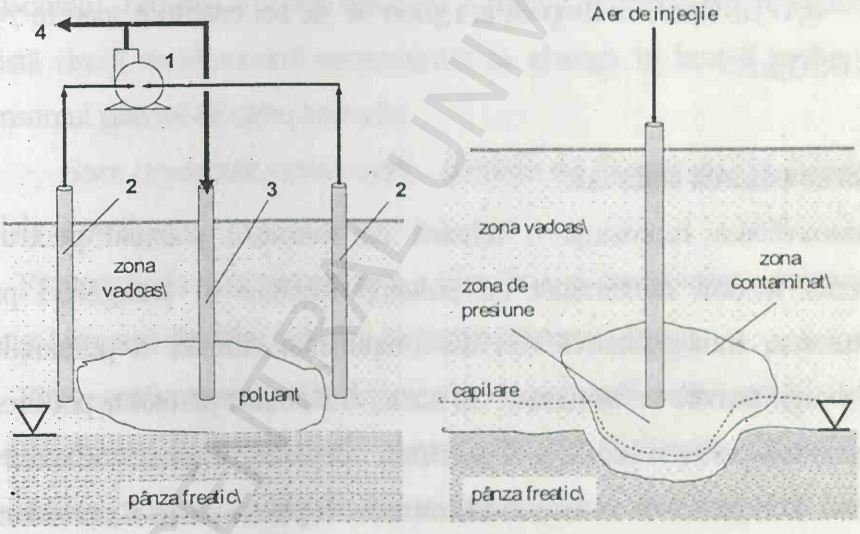


Fig.55 Tehnici alternative de bioaerare (după Gavrilă, 2007): a - în circuit închis; b - prin deshidratare sub presiune; 1 - compresor; 2 - puţuri de extracţie a aerului; 3 - puţuri de injecţie a aerului; 4 – evacuare parţială în atmosferă

Până în prezent bioaerarea a fost utilizată cu succes la remedierea unor soluri contaminate cu produse petroliere, solvenţi necloruraţi, anumite

pesticide, conservanţi pentru lemn etc. Cele mai rapide rezultate se obţin la degradarea componentelor cele mai toxice, solubile şi mobile din componenţa carburanţilor: benzen, toluen, etilbenzen, xileni. In mai puţin de un an, cantitatea acestora din sol se reduce cu peste 90%. Degradarea majorităţii compuşilor clorurati se poate realiza numai prin utilizarea unor co-metaboliţi (injectând metan în sol, de ex.), sau prin existenţa unui ciclu anaerob.

Bioaerarea este o tehnologie aplicabilă pe termen mediu spre lung. Rezultate vizibile se obţin în luni până la ani. Costurile bioaerării scad la creşterea volumului de sol tratat: la 600 m^3 sol, costurile sunt de 928 – 970 USD/m^3, în timp ce la 13000 m^3 de sol costurile scad la 79 – 109 USD/m^3.

Fitoremedierea solurilor

Fitoremedierea reprezintă o tehnică ce foloseşte plantele pentru a remedia mediul contaminat cu poluanţi organici şi anorganici prin înlăturarea, înmagazinarea sau descompunerea chimică a poluanţilor. Microorganismele ce se găsesc în zona rădăcinilor plantelor pot creşte capacitatea poluantului de a fi adsorbit, de către sistemul radicular al plantei. Din punct de vedere al fitoremedierii planta poate fi considerată ca fiind un sistem de pompare şi tratare care poate preveni răspândirea contaminării solurilor.

Eficienţa **plantelor** ca **"decontaminanţi"** sau "filtre" a fost dovedită în decontaminarea solurilor poluate cu **petrol brut, substanţe explozive, metale, pesticide, hidrocarburi policiclice aromatice.**

Plantele cu potenţial de fitoremediere mare pot fi alese dintre speciile din flora spontană ce cresc în locuri poluate sau dintre plantele

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

cultivate care au trăsături specifice, determinate de mediul poluant (Kömives şi Gullner, 2000). Pentru suprafeţe întinse sau medii, unde contaminarea este superficială sau moderată, fitoremedierea este o alternativă viabilă, preferată metodelor mecanice şi chimice tradiţionale. Comparată cu tehnologiile tradiţionale, fitoremedierea are două **avantaje** majore: este **relativ ieftină** şi are **impact redus asupra mediul.** De asemenea metoda are o **largă acceptare** din partea societăţii civile. Pe de altă parte tehnica de fitoremediere are şi unele **dezavantaje:** este un proces care se **desfăşoară în timp** (de obicei mai multe cicluri de vegetaţie), este **limitată doar la grosime solului** (atât cât pătrund rădăcinile), necesită înaintea aplicării o **lungă perioadă de cercetare** şi există riscul ca elementul contaminant să **ajungă în lanţul trofic** prin consumul plantei de către animale.

Sunt cunoscute următoarele **metode de fitoremediere** (Gleba şi colab., 1999):

- **Fitoextracţia** (fitoacumulare) - absorbţia şi translocarea poluanţilor din sol sau apă de către rădăcini în partea de sus a plantei;
- **Fitotransformarea** (fitedegradarea) – poluanţii sunt transformaţi în zona radăcinii sau în ţesuturile plantei prin reacţii chimice sub influenţa enzimelor produse de plante. Acest proces poate transforma poluantul anorganic într-un derivat insolubil, împiedicând astfel pătrunderea sa în lanţul trofic.
- **Fitovolatilizarea** – poluanţii sunt preluaţi de sistemul radicular al plantei, transmişi frunzelor – în forma nemodificată sau după transformări chimice – şi volatilizaţi în atmosferă.

BCU IAŞI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- **Rizotransformarea** – poluanţii din sol sunt transformaţi de către microorganismele care trăiesc în rizosferă.
- **Rizofiltrarea** – apa contaminată este purificată folosind capacitatea sistemului radicular al plantei de a fixa elementele contaminante.

Consideraţii teoretice

Sistemul plantă-sol-poluant este determinat de o combinaţie complicată de factori chimici, biochimici, fizici şi biofizici care pot juca un rol important în determinarea soluţiei ce vizează o anumită problemă de fitoremediere. Există o diferenţă semnificativă între capacitatea speciilor de plante de a prelua şi tolera poluanţii. Doar plantele cu anumite caractere biochimice pot fi avute în vedere în aplicarea unei soluţii de fitoremediere. În prezent sunt însă dezvoltate numeroase studii de bază în domeniul fiziologiei, biochimiei şi biologiei moleculare a plantelor care au pregătit drumul pentru dezvoltarea tehnicilor de fitoremediere (Kömives şi Gullner, 2000).

A. Fitoextracţia - Absorbţia şi deplasarea poluanţilor în plante

Biodisponibilitatea poluanţilor din sol este deseori un **factor limitativ** în ceea ce priveşte eficacitatea fitoremedierii (De Salt şi colab., 1998). Eficacitatea fitoremedierii solurilor poluate depinde de **proprietăţile fizico-chimice ale poluantului dar şi ale solului:** poluanţii pot fi fixaţi de particulele solului sau preluaţi de microorganisme, plante si animale. In procesul de fitoremediere, disponibilitatea poluantului de a fi preluat de microorganismele din rizosfera şi de sistemul radicular este

BCU MIRCEA CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

de mare importanţă. Absorbţia poluanţilor organici şi anorganici dizolvaţi în apă şi transportul acestora în ţesuturile plantelor poate fi mediată de sistemele de transport ale membranelor celulare sau, în mod alternativ, poate fi un proces pasiv reglementat de transportul apei prin intermediul celulelor. Pătrunderea prin membrana celulei şi transportul în interiorul plantei este puternic influenţată de **solubilitatea în apă a poluantului** ca şi de mărimea şi forma moleculelor sale sau de distribuţia sarcinilor electrice (Briggs şi colab., 1982).

Unii compuşi chimici de sinteză pot avea rolul de amendamente în procesele de fitoremediere. Aceştia ar putea fi folosiţi pentru a favoriza desorbţia poluanţilor din sol, îmbunătăţind astfel biodisponibilitatea acestora din urmă de a fi preluaţi de plantele şi microorganismele din rizosfera (De Salt şi colab., 1998).

B. Biotransformarea şi stocarea poluanţilor în ţesuturile plantelor

În ţesuturile plantelor vii, poluanţii sunt transformaţi printr-o mare varietate de reacţii metabolice, biochimice şi chimice. **Biotransformarea xenobioticelor** are loc după o succesiune de reacţii ce pot fi grupate în două faze: **faza I** reprezentată de reacţii de oxidare şi **faza II** în care au loc transformări ale produşilor rezultaţi în prima fază. În plante, metabolismul oxidativ caracteristic fazei I este mediat de enzime din grupa oxigenazelor (citocrom P 450). În faza II xenobioticele hidrofobe activate sunt convertite în forme cu proprietăţi hidrofile mult mai mari prin conjugarea cu zaharuri sau grupări sulfhidrice (-SH) (Kömives şi Gullner, 2000). Grupările –SH din structura tripeptidelor de la nivel celular oferă protecţie împotriva toxicităţii ionilor metalici dar şi a compuşilor organici alchilaţi.

BCU "CAROL I" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1. Biotransformarea

Informaţii detaliate asupra mecanismelor chimice de transformare a poluanţilor organici şi anorganici în plantele care au capacitatea de a metaboliza sau reţine aceşti compuşi sunt greu de obţinut. Sunt însă formulate câteva ipoteze. Prima dintre acestea afirmă că aşa numitele plante "tolerante" (plante ce manifestă capacitate de fitoremediere) "detoxifică" ionii metalelor grele pe calea unor reacţii chimice prin care aceştia sunt transformaţi în forme insolubile sau chelataţi cu acizi carboxilici sau tioli şi apoi înmagazinaţi în vacuolele unor celule.

O altă ipoteză, care vizează mai ales transformările din faza II postulează că metabolizarea poluanţilor în plante este condiţionată de conjugarea cu GHS (γ-L-glutamil-L-cisteinil-glicină) sau homoglutation (γ-L-glutamil-L-cisteinil-β-alanină) reacţie care reprezintă unul dintre cei mai importanţi paşi în reducerea sau eliminarea totală a toxicităţii unui compus organic.

Este de altfel cunoscut că enzima GSH transferaza (GST) mediază conjugarea GSH cu numeroşi compuşi chimici cu proprietăţi ierbicide după o schemă generală de reacţie de forma (Jablonkai şi colab., 1999):

$$GSH + X\text{-}R \xrightarrow{GST} GS\text{-}R + H\text{-}X$$

X-R=poluant

GS-R = GSH conjugatul poluantului

Enzimele de tipul GSH transaminază reprezintă o clasă de enzime cu o specificitate mare pentru diferite tipuri de substrat, care facilitează reacţii de tipul celei prezentate anterior, mai ales pentru substraturi cu

BCU MS/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

caracteristici hidrofobe electrofile. Cele mai multe informaţii asupra enzimelor de tip GST din plante le prezintă ca fiind implicate în procese de "detoxifiere" pentru un mare număr de ierbicide (Kömives şi Gullner, 2000), dar în mod evident, aceste enzime joacă un rol mult mai însemnat, putând fi implicate în fenomene generale de stress la plante.

Compuşii conjugaţi cu GSH obţinuţi nu sunt total lipsiţi de activitate biologică. Acumularea acestor metaboliţi în celule poate duce la o reducere activităţii de "detoxifiere" din faza II, printr-o inhibare a activităţii GSH transferazei.

2. Compartimentarea

În plante, produşii rezultaţi în urma metabolismului şi implicit poluanţii ajunşi în ţesuturile acestora sunt stocaţi în vacuolele celulare. Acest proces de stocare poate fi privit ca faza III a procesului şi este dependent de energia stocată în legăturile macroergice de ATP la nivelul membranei celulare. Prezenţa acestei energii poate face ca membrana să acţioneze ca o pompă ce trage spre interiorul vacuolelor compuşii cu caracter poluant stocându-i.

C. Reducerea toxicităţii sau detoxifierea speciilor oxigen active generate de către poluanţi

Radicalii oxigenaţi sunt produşi în urma unor transferuri de electroni sau prin diferite reacţii de oxido-reducere în ţesuturile plantelor. În condiţii de stress chimic producerea unor astfel de radicali este mult accentuată. De exemplu: concentraţiile micromolare de ioni de Hg (II) duc la reacţia de peroxidare lipidică în ţesutul frunzelor de porumb.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Plantele au posibilităţi de apărare împotriva efectelor radicalilor oxigenaţi produşi. Este cunoscut faptul că există un echilibru fragil între factorii care generează oxiradicalii şi sistemul de apărare a celulei împotriva efectelor nocive a acestora.

Protecţia antioxidantă este asigurată de trei categorii generale de compuşi care includ:

1 – **compuşi cu caracter reducător solubili în apă** cum ar fi compuşii ce conţin grupări tiol: cisteina, GSH); ascorbaţi; catehine;

2 – **compuşi lipo-solubili**: -tocoferol şi –caroten;

3–**antioxidanţi enzimatici**: GSH peroxidaza, ascorbat peroxidază, catalaza şi superoxid dismutaza (Pascal şi colab., 2002).

Poluanţi anorganici

A. Absorbţia şi translocarea (deplasarea compuşilor cu caracter poluant în plantă)

Ionii metalelor sunt fixaţi prin legături puternice de particulele de sol. Pentru a depăşi energia acestor legături plantele şi-au dezvoltat, de-a lungul evoluţiei lor, mecanisme prin care să îmbunătăţească biodisponibilitatea microelementelor care sunt indispensabile în nutriţie. Unul dintre aceste mecanisme constă în producerea şi secretarea unor compuşi naturali cu caracter chelatant pentru ionii metalelor, care pot imobiliza Fe, Cu, Zn punînd în libertate protonii care modifică pH-ul solului aflat în vecinătatea rădăcinilor. Modificarea de pH determină solubilizarea ionilor metalelor. Un mecanism analog de solubilizare a ionilor metalelor este declanşat şi de către bacteriile din rizosferă care au o acţiune sinergică cu procesul de fitoremediere a solurilor poluate cu poluanţi anorganici.

BCU IASI CENTRALA UNIVERSITY LIBRARY

O bună toleranţă la ionii metalici, dar mai ales la Zn o au plantele din familia *Arabidopsis, Triticum aestivum, Nicotina tabacum*, etc. (van der Zaal şi colab., 1999).

După solubilizarea din sol a ionii metalici aceştia sunt transportaţi prin xilem. Mobilitatea ionilor metalici în zona radiculară poate fi mult întârziată din cauza capacităţii de schimb ionic a celulelor ce delimitează xilemul. De aceea complecşii metal-chelat ar putea fi transportaţi cu mai multă uşurinţă prin transpiraţie.

Rolul amendamentelor - Anumiţi agenţi cu proprietăţi chelatante, naturali sau sintetici au capacitatea de a facilita în mod semnificativ absorbţia ionilor metalici din sol de către rădăcinile plantelor şi de a favoriza chiar transportul acestora spre părţile aeriene ale plantelor.

De aceea în practica de fitoremediere, pentru a îmbunătăţi absorbţia ionilor metalici se administrează, pe suprafaţa solului contaminat, chelatori naturali sau sintetici. Pentru decontaminarea unui sol contaminat cu Pb se poate folosi cu bune rezultate o cultură de *Brassica juncea* în condiţiile administrării de amendamente sintetice de tipul acidului etilen diamino tetraacetic (EDTA). Concentraţiile de Pb în ţesuturile plantelor sunt direct proporţionale cu concentraţiile de Pb din sol, dar şi cu concentraţia de EDTA administrat. EDTA poate de asemenea să îmbunătăţească acumularea de Cd, Cu, Ni şi Zi.

Pentru decontaminarea solurilor contaminate cu Pb se mai pot folosi culturi de mazăre (*Pisum sativum*) şi porumb (*Zea mays*). In interiorul plantelor, atomii de Pb sînt transportaţi sub forma de chelat-EDTA ceea ce indică faptul că EDTA-ul îmbunătăţeşte şi translocarea (migrarea ionilor în ţesuturile plantei). Pentru îndepărtarea uraniului din solurile contaminate se pot utiliza ca amendamente acizi organici de tipul

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

acid citric, acid acetic, acid malic. Dintre aceştia, acidul citric are capacitatea cea mai bună de a mobiliza uraniul din sol şi de a determina absorbţia acestuia în ţesuturile plantelor de *Brassica juncea* şi *Brassica chinensis*. Concentraţia de uraniu în ţesuturile plantelor este de zeci de ori mai mare în prezenţa acidului citric.

B. Biotransformarea

În condiţii normale, plantele sunt vulnerabile la toxicitatea ionilor metalici aflaţi la nivelul rizosferei. Aflate în perimetre contaminate, plantele au capacitatea de a dezvolta mecanisme prin care să poată tolera concentraţii relativ ridicate de ioni metalici în ţesuturile lor.

Unul dintre mecanismele posibile implică formarea complecşilor metal-chelat cu compuşi de tipul oligopeptidelor, ce au în structură grupări tiol (fitochelatanţi), proteine şi alţi produşi naturali cu masă moleculară mică, cum sunt aminoacizii şi acizii carboxilici. Prin acest tip de mecanism sunt adsorbiţi ioni de tipul Cu, Cd, Pb (Kömives şi Gullner, 2000).

Toxicitatea acestor metale ca şi a cromului, seleniului şi arseniului, manifestată asupra plantelor, poate fi redusă prin reacţii chimice de reducere şi/sau prin încorporarea elementelor menţionate în structura unui compus organic.

C. Stocarea elementelor toxice (încorporarea şi compartimentarea)

Acumularea metalelor în frunzele plantelor nu este un proces ce se desfăşoară în mod omogen. De exemplu, concentraţia de Ni în plantele de *Thlaspi montanum* este variabilă în funcţie de tipul de ţesut în care se acumulează. În această specie, acumularea nichelului se desfăşoară de

preferinţă în celulele epidermei frunzelor. Un studiu asupra acumulării zincului în frunzele de *Thlaspi caerulescens* a dovedit că acest metal este acumulat în celulele epidermale în concentraţii de 5-6 ori mai mari decât în celulele mezofile (Küpper şi colab., 1999). Mai precis, poluanţii anorganici se acumulează în vacuolele celulelor epidermei, iar procesul este de obicei dirijat de un proton.

Poluanţi organici

Posibilităţile de îndepărtare a poluanţilor organici (de tip cloroacetanilidă sulfonilureat, tiolcarbamaţi şi altele) prin tehnici de fitoremediere constituie o prioritate datorită mai ales a efectelor fitotoxice selective ale ierbicidelor ce au în compoziţie structuri chimice de felul celor mai sus menţionate. Poluanţii organici sunt prezenţi în concentraţii mari în sol şi în apele subterane. Poluarea poate apărea din cauza unor produse secundare rezultate în urma unor procese industriale sau agricole, produse petroliere, utilizarea unor ierbicide, pesticide sau a altor substanţe de combatere. De cele mai multe ori contaminarea solurilor din cauzele mai sus menţionate are loc pe suprafeţe foarte întinse astfel încât tehnicile clasice de remediere sunt fie foarte scumpe, fie în unele cazuri impracticabile. Fitoremedierea poate constitui în aceste cazuri o alternativă.

A. Absorbţia şi transportul poluanţilor organici

Absorbţia şi transportul poluanţilor organici din sol de către rădăcinile plantelor poate fi corelată cu proprietăţile fizico-chimice şi structurale ale acestor substanţe. De multe ori în aceste estimări se ia în considerare aşa numitul **factor de absorbţie** al rădăcinilor, parametru

definit ca raportul dintre concentraţia poluantului organic în rădăcină şi concentraţia acestuia în sol (Briggs şi colab., 1982).

Rolul amendamentelor - O problemă majoră pentru tehnicile de fitoremediere în cazul contaminării solurilor cu poluanţi organici o constituie slabă biodisponibilitate a poluanţilor. În scopul creşterii biodisponibilităţii compuşilor organici răspândiţi pe soluri cu scop ierbicid, companiile producătoare de chimicale au lansat pe piaţă produse ce au în compoziţie surfactanţi care îmbunătăţesc pe cât posibil solubilitatea în apă a ierbicidelor (ce au caracter lipofil) micşorând tensiunea superficială la interfaţa compus chimic/apă. Odată solubilizate cu ajutorul surfactanţilor, ierbicidele devin biodisponibile pentru a fi preluate de către specii de plante.

Solurile poluate cu compuşi aromatici de tip benzen sau alchil derivaţi ai acestuia (toluen, etilbenzen şi xilen) pot fi de asemenea decontaminaţi prin tehnici de fitoremediere.

Aceşti contaminanţi au caracter lipofil slab, iar extracţia lor din sol se poate realiza relativ uşor, mărind solubilitatea aparentă în apă a acestora. Se pare că ciclodextrinele au capacitatea de a creşte eluţia compuşilor organici din sol, având atât rol de surfactanţi, cât şi de agenţi de complexare, care pot forma incluziuni cu compuşi hidrofobi.

Studii efectuate asupra ciclodextrinelor naturale şi a hidroxipropil – ciclodextrinelor au relevant faptul că solubilitatea aparentă a benzenului, toluenului şi xilenului este mult îmbunătăţită în cazul în care în mediu au fost prezenţi şi aceşti compuşi (Kömives şi Gullner, 2000).

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

B. Biotransformarea

Majoritatea informatiilor asupra reacţiilor de biotransformare a compuşilor chimici organici în plante se referă la reacţiile de descompunere a pesticidelor. Literatura prezintă însă şi studii asupra reacţiilor de biotransformare a poluanţilor organici comuni (solvenţi aromatici, compuşi clorurati alifataci, explozivi). **Compuşii organici alifatici halogenaţi** cum ar fi tetraclorura de carbon, cloroformul şi tricloretilena (TCE) sunt folosiţi pe scară largă ca solvenţi şi se găsesc printre cele mai obişnuite substanţe toxice ce pot contamina diferite perimetre. Plantele pot juca un rol important în remedierea solului şi a apei freatice contaminate cu aceşti compuşi. Plante din familia *Populus* au capacitatea de a transforma tricloretena în tricloretanol, acid tricloracetic, acid dicloracetic şi o mică cantitate de CO_2.

La nivelul întregii plante tricloretena nu manifestă efecte toxice, chiar dacă, concentraţia acesteia în ţesuturi este cu mult mai mare faţă de cea raportată în perimetrele contaminate (Gordon şi colab., 1998).

Rezultate asemănătoare au fost obţinute în cazul tetraclorurii de carbon. În ţesuturile arborilor de plop poluanţii de tip hidrocarburi alifatice halogenate suferă procese de oxidare şi dehalogenare pentru ca în final să fie supuse unor mineralizări complete până la CO_2.

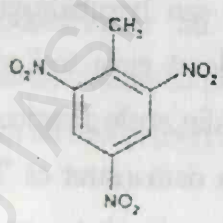
Solurile şi apele freatice contaminate cu **explozibili,** cum ar fi trinitroglicerina (GTN), trinitrotoluenul (TNT) sau hexahidroxi-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazină (RDX), reprezintă o problemă ceva mai greu de rezolvat. Îndepărtarea acestor tipuri de poluanţi din apele freatice a fost evaluată utilizând specii de plante acvatice. S-a demonstrat că TNT-ul este îndepărtat complet din apele de adâncime incubate cu plante acvatice, în timp ce concentraţia de RDX rămâne constantă.

Mineralizarea celor două substanţe, până la CO_2, cu ajutorul plantelor, este foarte slabă iar transformarea acestora în compuşi organici volatili este neglijabilă.

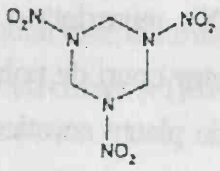
Pentru îndepărtarea TNT-ului din soluri contaminate au fost testate patru specii de plante superioare: două dicotiledonate şi două monocotiledonate. O cultură de *Avena sativa* are o mare toleranţă la TNT (1600 mg /kg) şi prezintă un bun potenţial de decontaminare.

Pentru îndepărtarea trinitroglicerinei se poate utiliza o cultură de sfeclă de zahăr (*Beta vulgaris*). În ţesuturile plantei, trinitroglicerina este transformată rapid în dinitroglicerină şi mai apoi în glicerol monohidrat. Cultura de tutun este de asemenea capabilă să supravieţuiască în prezenţă de trinitroglicerină sau TNT (Gong şi colab., 2000).

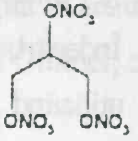
O altă problemă de mediu majoră o reprezintă contaminarea solurilor cu **ierbicide**. Ierbicidele de tipul cloroacetanilidă (în special acetoclor) sunt contaminanţii cele mai frecvente. Pentru decontaminarea acestor compuşi s-a utilizat un sistem integrat de fitoremediere, utilizând o cultură de porumb tratată cu benoxacor, iar la nivelul rizosferei plantelor a fost inoculată o tulpină de *Pseudomonas* capabilă să catabolizeze acest ierbicid. Această combinaţie de tratament chimic şi biologic reprezintă o abordare în scopul creşterii toleranţei plantelor şi a capacităţii de fitoremediere (Ch. Brunold, 1991).



TNT



RDX



GTN

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Cunoștințele asupra factorilor ce determină eficacitatea tehnicilor de fitoremediere s-au amplificat considerabil în ultimii ani. A devenit evident faptul că aceste procese sunt determinate de o succesiune de evenimente ale căror elemente pot juca un rol important în contracararea daunelor din țesuturile plantelor. Eficiența tehnicilor de fitoremediere pare să fie puternic influențată de capacitatea plantei de a "evita" concentrațiile prea mari ale formei toxice a poluantului și a speciilor oxigen active, care ar putea fi generate în țesuturile în care poluanții sunt stocați. Rolul important al γ-L-glutamil-L-cisteinil-glicină (GSH) în biotransformarea poluanților electrofili în unele plante "tolerante" precum și importanța sistemelor antioxidante de a contracara efectele nocive ale activității peroxidative a fost clar stabilit.

Totuși mai rămân multe aspecte de studiat mai ales în ceea ce privește specificul și mecanismul de inducție și transformare a poluanților. Progresele în biologia moleculară a plantelor, studiile *în vivo* și *în vitro* de urmărire a transformărilor poluantului, folosirea plantelor transgenice în practica de zi cu zi pot face din tehnicile de fitoremediere o importantă alternativă în protecția mediului.

Costurile fitoremedierii sunt scăzute: pentru un strat de sol de 50 cm adâncime costurile variază între 30 – 50 USD/m^3. Un hectar de sol contaminat tot la 50 cm, dar tratat *ex situ* prin biodegradare în straturi excavate costă între 0,99 și 4,2 milioane USD.

5.4.2. Tehnici de remediere *ex-situ*

Tehnicile *ex-situ* pot fi mai rapide, ușor de controlat și folosite pentru tratarea unei game largi de poluanți și pentru diferite tipuri de sol. Aceste

tehnici necesită însă excavarea şi tratarea solului poluat în instalaţii speciale.

Bioremedierea în fază de nămol (în bioreactoare)

Principiul acestei tehnici constă în biodecontaminarea solului, în instalaţii speciale formate din reactoare biologice (cuve închise, bazine, coloane, etc.). Metoda se poate aplica pentru depoluarea solului excavat căruia trebuie să i se asigure umiditate, de cele mai multe ori până la faza de nămol.

Metoda bioreactorului se recomandă în special în cazul depoluării solurilor cu conţinut ridicat de poluanţi organici: **motorină, combustibil lichid uşor, hidrocarburi aromatice policiclice, fenoli,** etc.

Tratarea biologică în fază de nămol poate fi un proces relativ rapid în comparaţie cu alte procese biologice de tratare, în special pentru solurile argiloase poluate. Succesul procesului este în mare măsură dependent de caracteristicile solului şi proprietăţile materialului contaminat. Această tehnologie este în special folositoare când rapiditatea metodei este o prioritate.

Înaintea tratării în bioreactoare, solul necesită o preparare mecanică ce include operaţiile de omogenizare, mărunţire şi clasare volumetrică. Solul astfel preparat este amestecat cu apă pană la obţinerea unui nămol în care partea solidă reprezintă cca. 30%. Compoziţia astfel obţinută este pompată într-un sistem de bioreactoare conectate în serie. Aerarea se face cu ajutorul unui dispozitiv situat la partea inferioară a bioreactorului. Aerul, încărcat cu COV este recuperat la partea superioară a bioreactorului fiind apoi dirijat spre o unitate de epurare a gazelor (ex. biofiltrul).

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Bioreactoarele trebuie să asigure următoarele condiţii:

- Amestecare perfectă a mediilor nutritive cu populaţia microbiană şi solul contaminat;
- Aerarea intensă pentru stimularea dezvoltării biomasei;
- Asigurarea unui timp optim de reacţie;
- Evacuarea solului depoluat şi a gazelor rezultate în urma degradării poluanţilor.

Factorii care limitează aplicabilitatea şi eficienţa acestei tehnici sunt:

- necesitatea excavării;
- clasarea materialelor înainte de introducere în reactor poate fi dificilă şi costisitoare;
- solurile neomogene sau argiloase pot crea probleme serioase de manipulare;
- este necesară găsirea unei metode acceptabile de utilizare a apelor uzate nereciclate în proces.

Costul tratării prin acest procedeu variază între 130 – 200 USD/m^3, respectiv între 160 – 210 USD/m^3 în cazul în care gazele rezultate din bioreactor trebuiesc ulterior tratate datorită prezenţei compuşilor volatili.

Bioremedierea în movile statice (biopilele cunoscute şi ca biocelule, biogrămezi, biomovile şi pile de compost) sunt utilizate pentru reducerea concentraţiei poluanţilor în solurile excavate. Este o tehnologie în care solul excavat este amestecat cu diverse amendamente şi aşezat pe o zonă de tratare prevăzută cu un sistem de colectare a scurgerilor şi cu posibilităţi de aerare. Se utilizează pentru reducerea concentraţiei produşilor petrolieri din sol prin biodegradarea acestora. Pentru

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

îmbunătăţirea biodegradării se reglează umiditatea, căldura, conţinutul de nutrienţi şi oxigen, pH-ul.

Zona de tratare este acoperită sau inclusă într-un strat impermeabil pentru minimizarea riscului scurgerii contaminanţilor în solul nepoluat. Scurgerile colectate pot fi de asemenea tratate într-un bioreactor înainte de recirculare. La ora actuală există diverse variante comerciale ale procedeului, în care reţete speciale de nutrienţi şi aditivi sunt încorporate în sol pentru stimularea biodegradării. Aceste reţete sunt de regulă elaborate în funcţie de condiţiile specifice ale sitului tratat.

Solul contaminat excavat este depus în grămezi, având în vedere ca atât intrările şi ieşirile fazelor gazoase şi lichide să fie riguros controlate. Biopilele sunt de obicei construite prin ridicare pe înălţime. Solul amestecat este ridicat în grămadă la o înălţime nu mai mare de câteva picioare şi conductele de distribuţie a apei sunt aşezate înaintea unui nou strat. Acest proces este repetat până ce grămada este suficient de înaltă (Vidali, 2001).

Aerarea grămezii de sol poluat se face cu ajutorul unui sistem de conducte perforate, instalate la baza grămezii, într-un strat permeabil format din pietriş. Pentru umectarea solului, distribuirea nutrienţilor şi a microorganismelor se foloseşte un dispozitiv de aspersiune situat sub membrana impermeabilă. Efluenţii lichizi ce ies din grămadă sunt colectaţi într-un bazin, cu ajutorul unei rigole, de unde sunt repompaţi şi administraţi prin aspersiune deasupra grămezii.

Procesul propriu-zis de decontaminare a solului începe prin aspirarea şi tratarea gazelor existente în grămada de sol poluat. Gazele sunt aspirate de către o pompă de aer prin conductele perforate situate la baza grămezii şi tratate într-un biofiltru înainte de evacuarea lor în

BCU Cluj / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

atmosferă. După epuizarea substanțelor volatile din gazele aspirate începe operația de aerare a grămezii (are loc intensificarea procesului de biodegradare) prin schimbarea sensului de circulație al aerului (Neag 1997).

Movilele pot fi acoperite cu folii de plastic pentru controlul evaporării apei și volatilizării compușilor organici, precum și pentru favorizarea încălzirii solare. Dacă în sol există COV care trec în fluxul de aer, aerul care părăsește solul poate fi tratat pentru îndepărtarea sau distrugerea COV înainte de descărcarea în atmosferă.

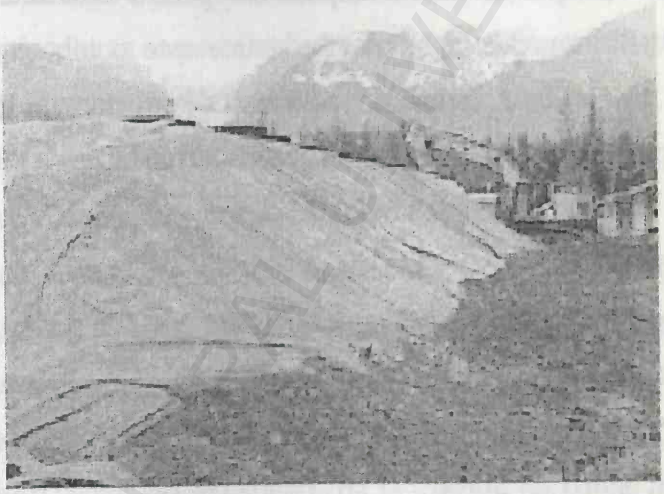


Fig. 56 Movilă statică (biopilă)

Bioremedierea în movile statice este o tehnologie aplicabilă pe termen scurt: săptămâni până la câteva luni. Tehnologia se pretează bine la distrugerea **COV monohalogenați precum și a hidrocarburilor din combustibili.** Poate fi aplicată și la tratarea anumitor COV halogenați, COSV, **pesticide,** cu o eficiență variabilă.

Printre dezavantajele acestei tehnici se pot menționa:

- necesitatea excavării solului;
- procesele în fază solidă au o eficienţă redusă în cazul derivaţilor halogenaţi şi nulă în cazul reziduurilor de explozivi;
- la aceeaşi dimensiune a şarjei, timpul necesar depoluării complete este mai ridicat decât în cazul bioremedierii în fază de nămol;
- procesul fiind static, tratarea este mai puţin uniformă decât în cazul proceselor care implică o amestecare periodică a fazei solide.

Costurile tratării depind de tipul contaminantului, necesitatea pre- sau post tratării, necesitatea unor echipamente pentru controlul emisiilor atmosferice. Bioremedierea în movile statice este o tehnologie relativ simplă, cu un necesar redus de personal de operare şi întreţinere. Costurile tipice sunt de 130 – 260 USD/m^3 de sol tratat.

Compostarea

Compostarea este un proces biologic controlat prin intermediul căruia o serie de contaminanţi organici sunt transformaţi aerob sau anaerob de către microorganisme în produse netoxice. Solul contaminat excavat este amestecat cu agenţi de afânare şi amendamente organice (rumeguş, fân, gunoi de grajd, resturi vegetale etc.). Alegerea corectă a amendamentelor asigură o porozitate adecvată, precum şi un echilibru carbon-azot care să asigure condiţii termofile (54– 65 °C) de dezvoltare a microorganismelor. O eficienţă maximă a degradării se obţine prin aerare (întoarcerea zilnică a movilelor de compost), irigare (dacă este necesar) şi o monitorizare atentă a temperaturii şi a conţinutului de umiditate. In timpul compostării pot avea loc emisii în atmosferă dacă în solul contaminat sunt prezenţi

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

COV sau COSV, caz în care sunt necesare echipamente pentru controlul emisiilor.

Există trei variante tehnologice de realizare a compostării:

- compostarea în movile statice aerate: compostul este clădit în movile și aerat prin intermediul unor suflante sau al unor pompe de vid;
- compostarea în reactoare cu agitare mecanică: compostul este introdus într-un vas de reacție în care este amestecat și aerat;
- compostarea în movile lungi: compostul este clădit în movile lungi, fiind periodic amestecat cu echipamente mobile. Aceasta este considerată ca fiind cea mai ieftină alternativă de compostare.

Compostarea se poate aplica solurilor și sedimentelor contaminate cu compuși organici biodegradabili.

Ca dezavantaje se pot menționa:

- necesitatea unui spațiu substanțial pentru compostare;
- apariția emisiilor de COV la excavarea solului;
- creșterea volumului materialului solid în urma compostării, ca urmare a adaosurilor de amendamente;
- imposibilitatea reducerii conținutului de metale grele.

Costurile compostării sunt în funcție de volumul de sol tratat, fracția de sol din compost, disponibilitatea amendamentelor, tipul contaminantului, varianta tehnologică de compostare aleasă. La un volum de sol de circa 15000 m^3 contaminat cu explozivi, costurile de tratare sunt de 249 USD/m^3 la compostarea în movile lungi, 308 USD/m^3 la compostarea în movile statice aerate și 380 USD/m^3 la compostarea în reactoare cu agitare mecanică (Gavrilă, 2007).

BCU IASI CENTRALA UNIVERSITARA LIBRARY

Metoda landfarming

Constă în tratarea solului poluat prin executarea unor lucrări cu specific agricol. Solul poluat excavat este depus pe o suprafaţă plană, impermeabilă, într-un strat cu grosimea de 40–45 cm. Se tratează cu îngrăşăminte sau cu gunoi de grajd, după care, periodic straturile sunt răsturnate sau lucrate pentru aerare. De cele mai multe ori, condiţiile din strat sunt controlate pentru optimizarea vitezei de degradare a poluanţilor. Se practică controlul umidităţii (prin irigare sau pulverizare de apă), aerării (prin lucrarea solului cu o frecvenţă prestabilită are loc amestecarea şi aerarea), pH-ului (prin neutralizare cu piatră de var sfărâmată sau cu var agricol), amendamentelor (prin adăugare de afânători, nutrienţi etc.).

Aportul de fertilizanţi ameliorează echilibrul nutrienţi – sursă de carbon (poluanţi), iar în cazul gunoiului de grajd, creşte cantitatea de microorganisme disponibile. La intervale regulate de timp, solul poluat este săpat şi întors în vederea aerării şi omogenizării. În timpul lucrărilor se pot administra din nou fertilizanţi pentru completarea cantităţilor iniţiale sau se pot însămânţa leguminoase (Neag, 1997).

În general, procesul de biodegradare prin metoda „landfarming" durează câteva luni. Cele mai bune randamente se obţin în timpul verii şi prin menţinerea unei umidităţi constante.

Aplicarea acestor tehnologii implică atât costuri anterioare aplicării şi independente de volumul tratat (25000 – 50000 USD pentru studii de laborator, până la 100000 USD pentru studii pe pilot şi experimentări în teren), precum şi costuri de exploatare, care nu depăşesc 100 USD/m^3 (Gavrilă, 2007).

CAPITOLUL VI
Biotehnologii de depoluare a fluxurilor gazoase

Depoluarea pe cale biologică (biofiltrarea) a fluxurilor gazoase se bazează pe degradarea într-un mediu umed a unor poluanți ai aerului cu ajutorul bacteriilor aerobe fixate pe un suport solid. Populația bacteriană utilizată în proces are rolul de a transforma poluanții în compuși mai puțin poluanți sau nepoluanți.

Sistemele de biofiltrare au fost folosite pentru prima dată în epurarea fluxurilor gazoase în scopul de a realiza minimizarea mirosurilor dezvoltate în secțiile de tratare a apelor uzate (tab. 20). Gazele rezultate în secțiile de tratare conțin hidrogen sulfurat, mercaptani și alți compuși cu sulf. După anul 1990, biofiltrele sunt utilizate și pentru îndepărtarea poluanților ca: hidrocarburi alifatice și aromatice, alcooli, aldehide, acizi organici, acrilați, amine și amoniac.

In general, tratamentele pe cale biologică sunt limitate pentru concentrații ale poluanților sub 1,5 g/m^3, eficacitatea de epurare a emisiilor poluante fiind de 90 până la 99%, pentru debite cuprinse între 4000 – 100000 m^3/h (limitele de debit sunt legate de volumul materialului filtrant, aproximativ 1 m^3 de material filtrant pentru 100 m^3/h aer tratat).

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 20

Scurt istoric al utilizării tehnicilor de biofiltrare în purificarea fluxurilor gazoase

Anul	Utilizare
1923	Prima încercare de utilizare a unei metode biologice pentru tratarea emisiilor de H_2S de la staţiile de tratare a apelor uzate
1955	Biofiltrarea este pentru prima dată aplicată în Europa, în Germania pentru tratarea mirosurilor
Anii '60	Sistemele de biofiltrare sunt utilizate pentru tratarea poluanţilor gazoşi atat în Europa cat şi în Statele Unite
Anii '70	Se începe construcţia de biofiltre
Anii '80	Biofiltrarea este utilizată pentru tratarea emisiilor de compuşi organici volatili de la diferite procese industriale
Anii '90	In europa sunt în funcţiune mai mult de 500 de biofiltre în special în Germania şi Olanda

6.1. Principiul şi tehnicile de biofiltrare

La purificarea gazelor reziduale prin biofiltrare, substanţele poluante inclusiv cele care generează mirosuri sunt descompuse cu ajutorul microorganismelor. Produsul final al descompunerii biologice este format, în cazul ideal, din dioxid de carbon, apă şi biomasa microbiană. Principiul tehnicilor de biofiltrare este relativ simplu: substanţele poluante sunt adsorbite pe suprafaţa unui material suport şi apoi descompuse cu ajutorul microorganismelor dispuse sub formă de biofilm pe suprafaţa de suport. Metoda este adecvată, în principal, pentru compuşi poluanţi cu o bună solubilitate în apă (Bank, 1995).

Compoziţia microbiană şi activitatea microorganismelor sunt asigurate, într-un mod optim, numai atunci când în stratul de filtrare sunt

îndeplinite anumite condiţii de mediu, referitoare la umiditate, valoarea pH-ului, temperatură şi conţinut de substanţe nutritive. Din acest motiv, înainte de introducerea în biofiltre a gazului rezidual cu conţinut de substanţe poluante, acesta trebuie supus, de la caz la caz, unei etape de analiză şi control şi unui tratament preliminar (Schneider şi colab., 1996, Windsperger 1991).

6.1.1. Structura instalaţiei de biofiltrare

In linii foarte generale o instalaţie de biofiltrare a fluxurilor gazoase este compusă din:

- etapa de condiţionare preliminară a gazului rezidual;
- dispozitiv de distribuire a gazului brut pentru o curgere uniformă prin stratul filtrant;
- material-suport pe care se distribuie uniform materialul filtrant;
- stratul filtrant.

Un filtru biologic este alcătuit de obicei dintr-o carcasă cilindrică sau cu secţiune dreptunghiulară care conţine la partea inferioară un plen închis, un raft de sprijin şi unul sau mai multe straturi de material filtrant în partea de sus a raftului de sprijin (fig. 57).

Ca strat de material filtrant sunt utilizate diferite materiale naturale (turbă, scoarţă de copac) sau sintetice (zeoliţi), organice (polimeri) sau minerale (pietriş).

Raftul de sprijin este perforat pentru a permite aerului de la plen să pătrundă în stratul mijlociu pentru a intra în contact cu populaţia microbiană care se dezvoltă în stratul de material filtrant sub formă de biofilm.

BCU "VASILE GOLDIŞ" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

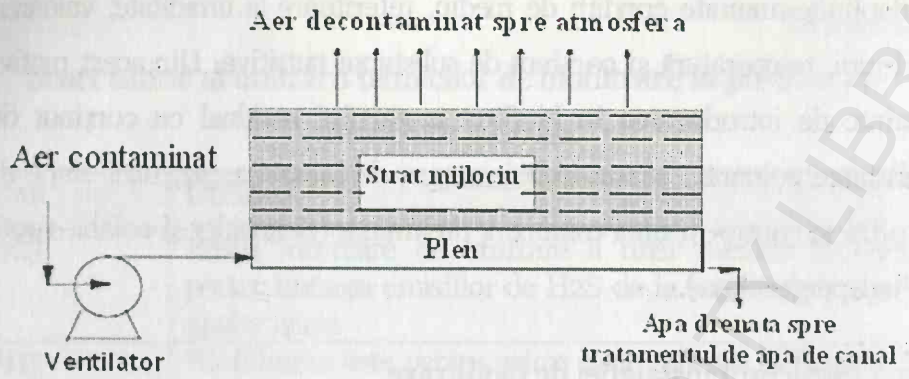


Fig. 57 Schema de principiu a unui biofiltru tradiţional

Etapa de condiţionare a gazului rezidual constă în reglarea temperaturii şi umidităţii acestuia (fig. 58).

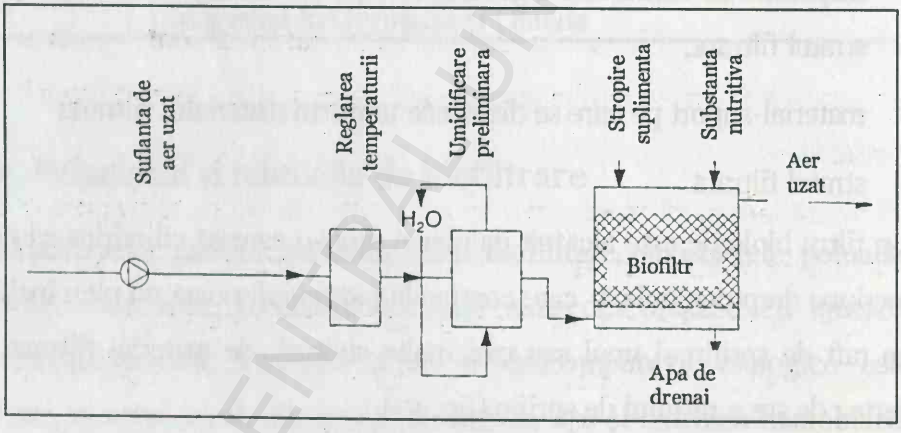


Fig. 58 Condiţionarea gazului rezidual înainte de tratare

Avantajele biofiltrelor:

- Costuri de instalare scăzute. Majoritatea biofiltrelor sunt construite din materiale comune precum cherestea, fibră de sticlă sau tuburi de material plastic şi sunt relativ uşor de asamblat;

BCU ASICENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- Costuri de exploatare de obicei scăzute (acestea constau în costul energiei electrice pentru funcționarea suflantei, manopera pentru verificarea procesului și costurile nutrienților necesari a fi adăugați cu o anumită frecvență pentru întreținerea materialului biologic);
- Randamente bune de depoluare pentru fluxuri gazoase ce conțin aldehidele, acizi organici, protoxid de azot, dioxid de sulf și hidrogen sulfurat.

Dezavantajele biofiltrelor:

- Spațiu relativ mare pentru amplasare;
- Debit intern variabil (pentru reglarea pH-ului stratului sau pentru adăugarea de nutrienți);
- Lipsa de oxigen sau de substante nutritive poate conduce la formarea zonelor anaerobe sau la inactivarea sau moartea populației microbiene;
- Microorganismele sunt specializate în descompunerea unor anumite substanțe și, din acest motiv, în cazul unei conversii a tehnologiei, sunt necesare perioade semnificative de adaptare;
- Produsele intermediare obtinute în urma descompunerii microbiene trebuie avute în vedere la înlocuirea materialului filtrant;
- Proiectul unui biofiltru tradițional nu are suprafața exterioară acoperită făcând dificilă prelevarea de mostre reprezentative pentru controlul emisiilor evacuate;
- Stratul natural folosit în bofiltru trebuie înlocuit o dată la 2-5 ani. Operația de înlocuire poate dura între 2 și 6 săptămâni în funcție de mărimea stratului filtrant.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

In timp au fost realizate modificări pentru eliminarea deficienţelor în proiectarea biofiltrelor tradiţionale. Pentru creşterea timpului de contact cu populaţia microbiană au fost introduse trasee pentru recircularea emisiilor, carcasă şi a unei supape la biofiltru (fig. 59).

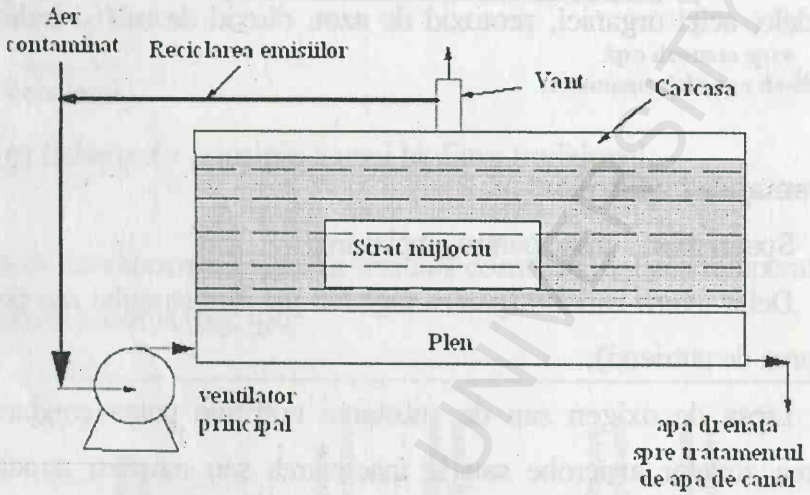


Fig. 59 Schema îmbunătăţită a unui biofiltru tradiţional (recirculare)

De asemenea, dacă spaţiul disponibil permite, biofiltrele pot fi amplasate în baterii cu dispoziţie orizontală sau verticală. Configuraţie în serie este reprezentată în figura 60.

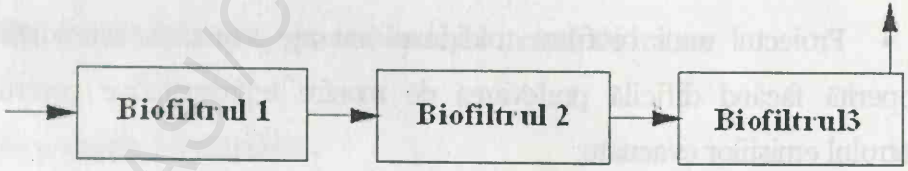


Fig. 60 Biofiltre în serie dispuse orizontal

6.1.2. Variante tehnologice de purificare a gazelor reziduale prin metode biologice : biofiltre, biofiltre cu percolare, bioscrubere

A. Biofiltre

La purificarea gazelor reziduale cu ajutorul biofiltrelor, substanțele poluante, inclusiv mirosurile, sunt degradate cu ajutorul microorganismelor (fig. 61). Eficacitatea biofiltrelor depinde de timpul de contact între fluxul de aer poluat și biofilmul format pe suportul filtrant; acesta trebuie să fie suficient pentru ca poluantul sau amestecul de poluanți din fluxul gazos să fie mai întâi absorbit în pelicula biofilmului și apoi degradat de către microorganismele prezente.

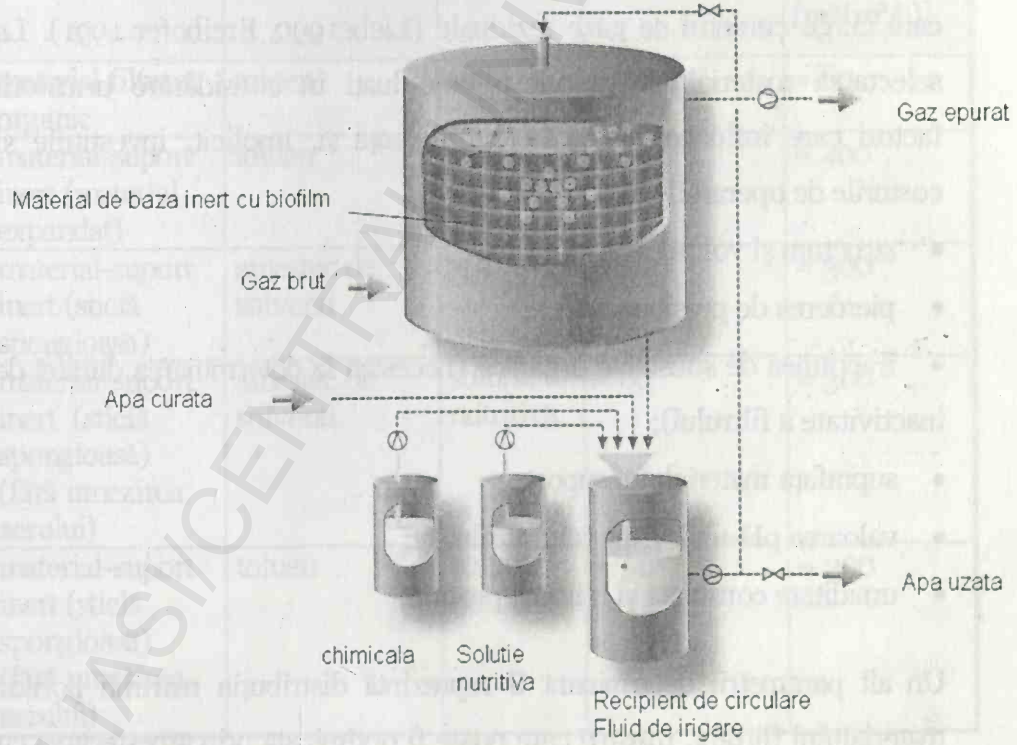


Fig. 61 Secțiune într-un sistem de biofiltrare

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Premisa păstrării eficienței filtrului o constituie un material-suport care să poată asigura suficiente elemente nutritive necesare microorganismelor implicate în proces. Din acest motiv sunt utilizate în principal materiale organice naturale cum ar fi:

- turbă;
- compost (ex: compost din gunoi de grajd);
- rumeguș sau resturi lemnoase rezultate din curățarea pădurilor;
- materiale inerte (ex: argila expandată, lavă vulcanică).

In cazul materialelor filtrante inerte este necesară o completare continuă cu mediu de cultură.

De regulă, aceste materiale sunt dispuse ca straturi bine dozate prin care curge curentul de gaze reziduale (Liebe1990, Breihofer 1991). La selectarea materialului filtrant trebuie luați în considerare următorii factori care influențează hotărâtor eficiența și, implicit, investițiile și costurile de operare:

- structura și volumul porilor;
- pierderea de presiune;
- fracțiunea de substanțe organice (necesară la determinarea duratei de inactivitate a filtrului);
- suprafața materialului suport;
- valoarea pH-ului materialului filtrant;
- umiditate constantă și mirosul propriu.

Un alt parametru determinant îl reprezintă distribuția mărimii porilor materialului filtrant, mărime care poate fi optimizată prin amestecarea cu argilă expandată mărunțită și calcinată. Astfel se poate realiza sporirea capacității liante a apei, sporirea stabilității de lungă durată, evitarea

stărilor critice precum şi neajunsurile cauzate de străpungeri în zona marginilor şi uscarea necontrolată a materialului filtrant.

Tabelul 21 oferă o privire de ansamblu asupra caracteristicilor unor materiale suport.

Tabelul 21

Eficienţa şi condiţiile de lucru pentru diferite materiale suport

Material-suport pentru filtru	Solvent supus tratamentului	Umidificare	Eficienţa specifică de descompunere [g/(m³/h)]	Flux volumetric al aerului/volumul filtrului [m³/(m³/h)]
material filtrant organic	toluen	apă	≈ 20	≈ 80
material-suport inert (material expandat)	toluen	soluţie nutritivă	≈ 80	≈ 400
material-suport inert (sticlă spongioasă)	amestec de solventi	apă	≈ 20	≈ 300
material-suport inert (sticlă spongioasă) (fără umezirea aerului)	amestec de solventi	soluţie nutritivă	≈ 80	≈ 300
material-suport inert (sticlă spongioasă) (fără umezirea aerului)	toluen	soluţie nutritivă	≈ 50	≈ 200

BCU "MIHAIL KOGĂLNICEANU" UNIVERSITY LIBRARY

B. Spălătoare biologice

Spălătoarele biologice se utilizează în special pentru eliminarea emisiilor purtătoare de mirosuri precum şi a emisiilor de COV. Realizarea tehnică a proceselor de absorbţie imediată necesară procesului are loc în absorbere în care mediul absorbant este adus în contact cu amestecul de gaze supus procesului de purificare. Substanţele absorbite din fluxul de gaze reziduale sunt, în final, descompuse de microorganisme.

Structura instalaţiei

In cazul spălătoarelor biologice pot fi deosebite două principii de funcţionare:

- In cazul **metodei cu nămol activ**, microorganismele sunt fin distribuite în apa de spălare. Prin spălător curge un lichid de spălare adecvat, în contracurent cu gazul rezidual. Din punct de vedere constructiv, este foarte importantă realizarea unei suprafeţe cât mai mari de contact a celor două faze şi pentru aceasta sunt cunoscute mai multe variante şi anume: spălătoare cu corpuri de umplere, cu coloane cu talere, spălătoare cu pulverizare sau ajutaje. Microorganismele conţinute de apa de spălare preiau substanţele poluante şi formează împreună cu acestea un nămolul activ. Regenerarea lichidului de spălare are loc într-un bazin de epurare cu nămol activ (fig. 62). Metoda cu nămol activat se aplică, de exemplu, atunci când procesele de descompunere sunt relativ lente. Pentru aceasta, etapa regenerativă poate fi adaptată independent de etapa de absorbţie, în funcţie de concentraţia de substanţe poluante şi de viteza de descompunere. (Bank, 1995).

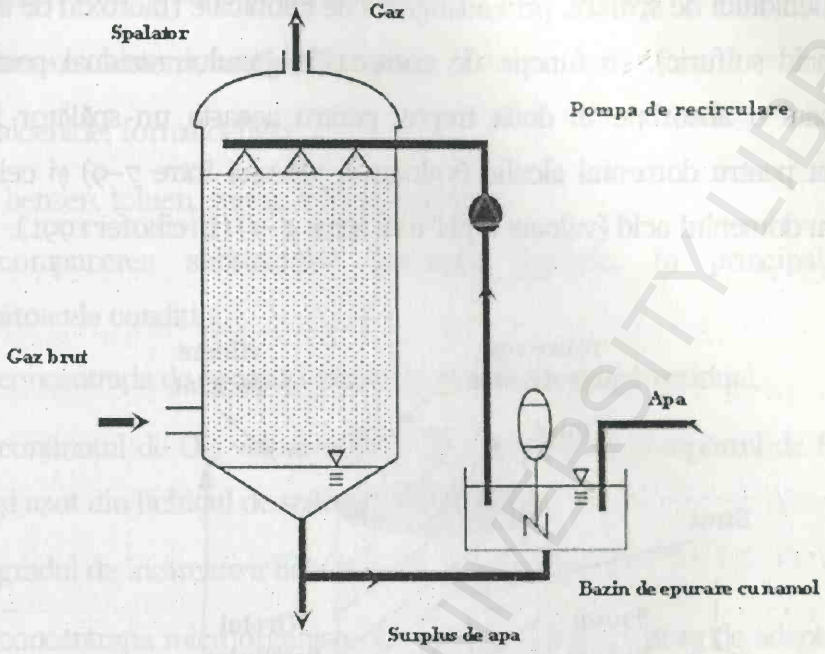


Fig. 62 Schema unui spălător cu nămol activ.

- In cazul **metodei cu percolare continuă**, coloniile de microorganisme necesare în proces sunt depuse pe instalații sau pe particulele de umplere (ex: spume de poliuretan). Mediul absorbant (apa) ce curge peste acestea asigură microorganismelor necesarul de oxigen și substanțe nutritive, substratul fiind astfel regenerat (Breihofer 1991).

Lichidele de spălare regenerate sunt reponpate în circuit către spălător. Substanțele separate servesc ca substrat nutritiv pentru microorganisme. In lichidul de spălare se ajunge, în urma evaporării, la o creșterea concentrației de săruri. Acumularea acestora se poate evita prin transvazarea mediului absorbant și prin alimentarea cu apă curată. Pentru ameliorarea gradului de separare poate fi necesară o ajustare a valorii pH-

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ului lichidului de spălare, prin adăugarea de chimicale (hidroxid de sodiu sau acid sulfuric). In funcţie de compoziţia gazului rezidual poate fi necesară o absorbţie în două trepte, pentru aceasta un spălător fiind ajustat pentru domeniul alcalic (valoare a pH-ului între 7–9) şi celălalt pentru domeniul acid (valoare a pH-ului între 4 -7) (Breihofer 1991).

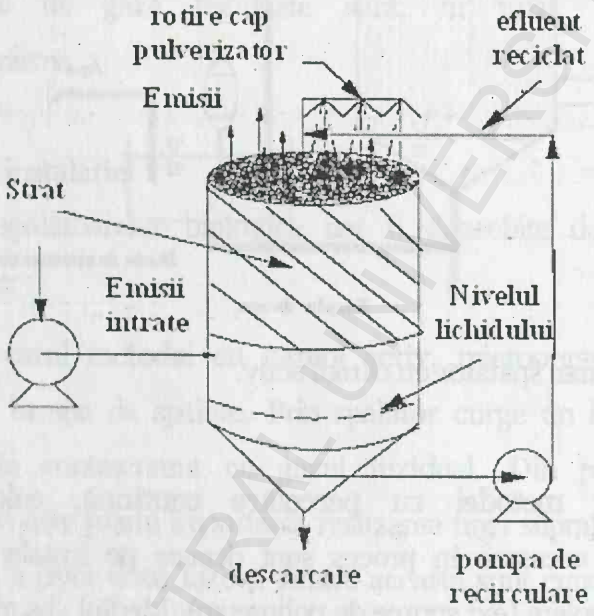


Fig. 63 Schema unui biofiltru cu percolare continuă

Substanţe tratabile: următorii solvenţi precum şi amestecuri ai acestora pot fi descompuşi biologic prin metoda prezentată anterior:

- alcooli: etanol, izopropanol, metanol;
- fenoli;
- glicoli: etilen-glicol,

- ester: metil-esterul acidului acetic;
- cetone: acetona, metil-etil-cetona;
- aldehide: formaldehida;
- benzen, toluen, stiren, solvenţi clorurați.

Descompunerea substanţelor poluante depinde, în principal, de următoarele condiţii:

- concentraţia de compuşi organici volatili din gazul rezidual,
- conţinutul de O_2, valoarea pH-ului, temperatura şi raportul de fosfor şi azot din lichidul de spălare,
- gradul de încărcare a lichidului de spălare cu COV,
- concentraţia microorganismelor şi capacitatea acestora de adaptare la COV ce trebuie degradaţi.

Domenii de utilizare

La fel ca şi biofiltrele, spălătoarele biologice au fost utilizate iniţial, în principal, pentru îndepărtarea mirosurilor. Aria de utilizare s-a extins până la reducerea emisiilor rezultate la procesele de lăcuire, vopsitorii, etc., în măsura în care gazele reziduale prezintă concentraţii ai compuşilor organici de până la cca. 2 g /Nm^3. Spălătoarele biologice sunt adecvate, în special, pentru debite volumice mari ale gazelor reziduale (până la 1 000 000 Nm^3/h). (Schulze 2002).

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

C. Bioscrubere

Bioscruberele reprezintă o tehnică îmbunătățită a biofiltrelor cu percolare încercând să rezolve două probleme ale acestora din urmă:

1. îmbunătățirea absorbției poluanților în lichid;
2. mărirea timpului de contact între faze în scopul măririi duratei de consum a poluanților.

Aceste obiective pot fi realizate în 2 moduri: pe de o parte umplutura coloanei este inundată de faza lichidă şi pe de altă parte scurgerea de fază lichidă este colectată într-un rezervor de apă înainte de a fi recirculată în bioscruber. Schema de principiu a unui bioscruber este prezentată în figura 64.

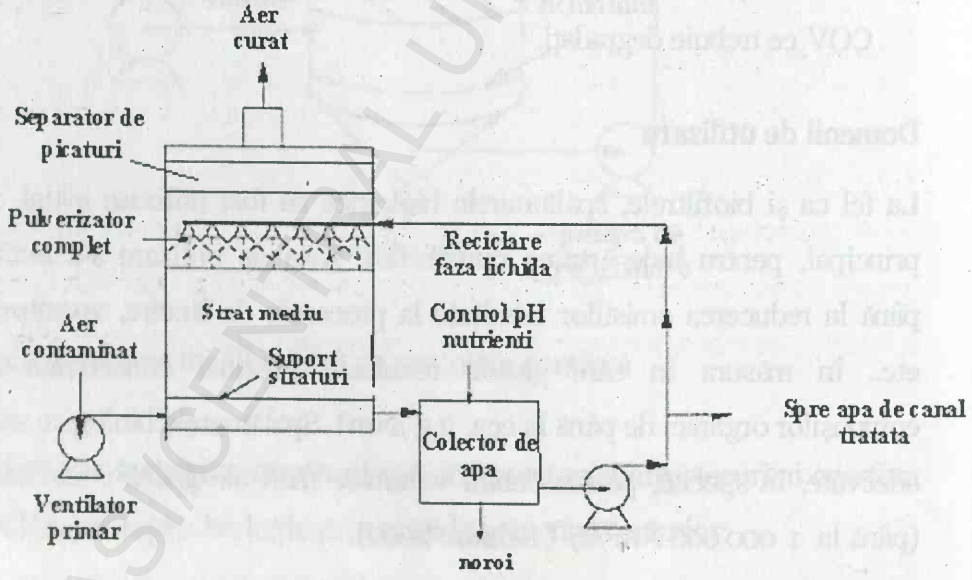


Fig. 64 Schema de principiu a unui bioscruber

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Inundarea stratului creşte abilitatea fazei lichide de a absorbi poluanţii deoarece în momentul în care faza gazoasă intra în contact cu stratul mijlociu formează mici bule care sporesc suprafaţa interfaţei între faza gazoasă şi faza lichidă. Implicit, mărirea acestei suprafeţe îmbunătăţeşte abilitatea fazei lichide de a absorbi poluanţii. Colectorul de apă serveşte drept rezervor pentru faza lichidă şi acordă un timp de reacţie suplimentar pentru consumul poluanţilor de către microorganisme. Timpii de reacţie pot fi măriţi începând de la 60 min. sau mai mult în funcţie de ritmul de recirculare a fazei lichide şi volumul colectorului de apă.

Avantajele bioscruberului:

- Nu sunt necesare pretratamente aplicate emisiilor de gaze (umidificare, desprăfuire);
- Bioscruberul poate trata emisii de gaze care conţin particule solide ;
- Controlul pH-ului şi a nutrienţilor se poate realiza automat;
- Procesul este ideal pentru emisiile gazoase care în urma degradării de către microorganisme generează produşi cu caracter acid.

Dezavantajele bioscrubberului:

- Instalarea este mai scumpă decât în cazul altor biofiltre deoarece implică mai mult echipament chimic.
- Concentraţii prea mari de nutrienţi pot cauza creşterea accentuată a biomasei microbiene care poate conduce la blocarea bioscruberul;
- Costurile de proiectare pot fi mai mari decât la alte biofiltre.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Pentru tehnicile de biofiltrare prezentate anterior sunt cunoscute şi costurile de operare. O analiză comparativă a acestora este prezentată în tabelul 22.

Tabelul 22

Costuri în folosirea proceselor de biofiltrare

Proces	Costuri totale, $	Manopera, $	Nutrienți $	Curățarea straturilor, $	Costuri indirecte, $	Total costuri anuale, $
Biofiltru	8,560	1,780	640	1,605	1,200	5,225
Biofiltru percolator	42,800	1,780	640	1,605	6,000	10,025
Bioscruber	337,900	3,420	1,284	2,140	47,300	54,144

6.2. Factori care influențează procesele de biofiltrare

Temperatura

Temperatura este probabil cel mai important factor care afectează operațiile de biofiltrare. Un debit mare de aer cald poate determină inactivarea uneori definitivă a biomasei utilizate în proces. Cele mai multe microorganisme au o dezvoltare normală în intervalul de temperatură de 30 - 41° C. Temperatura stratului de mediu filtrant trebuie să fie monitorizată la fiecare opt ore.

Deoarece în general emisiile gazoase rezultate în procese industriale sunt calde, acestea sunt trecute înainte de etapa de biofiltrare printr-un umidificator care are şi rolul de a răci aceste gaze. Aceasta este metoda

BCU "ASCENTRA" UNIVERSITY LIBRARY

cea mai economică utilizată pentru răcirea emisiilor de la 93 -149° C la sub 41 °C. In afară de efectul de răcire, acest proces creşte şi conţinutul de umiditate al curentului de aer.

Fluxurile gazoase reci inhibă de asemenea activitatea microorganismelor (fără a produce moartea acestora). Pentru eficienţa procesului de biofiltrare, în timpul lunilor de iarnă ar putea fi necesară încălzirea emisiilor folosind metode directe sau indirecte.

Umiditatea - Al doilea factor limitativ este umiditatea stratului de material filtrant. Microorganismele necesită umiditate pentru a supravieţui şi pentru aceasta creează un biofilm care are capaciatea de a absoarbi poluanţii din curentul de aer astfel încât aceştia pot fi asimilaţi de către microorganisme. Problemele privind umiditatea scazută pot fi corectate trecând emisiile printr-un umidificator. Având emisii aproape de saturaţie (100% umiditate relativă) se vor rezolva majoritatea problemelor legate de stratul de mediu prea uscat.

Umiditatea scazută, pe perioade scurte, nu conduce la moartea microorganismelor utilizate în biofiltrare, dar le reduce mult eficienţa. Pe de cealaltă parte însă, o umiditate excesivă va cauza creşterea căderii de presiune în stratul filtrant şi uneori curgeri preferenţiale ceea ce duce la pierderea eficienţei procesului de biofiltrare. Curgerile preferenţiale ar putea cauza de asemenea distrugerea stratului de material filtrant.

Este important de amintit că apa este un produs al proceselor biologice ce au loc în timpul biofiltrării. De aceea, dacă emisiile supuse biofiltrării sunt saturate, în timpul procesului rezultă o cantitate de apă care se acumulează în stratul de mediu. Pentru acest motiv, întotdeauna trebuie să se prevadă un spaţiu, în camera de distribuţie a aerului, pentru apa ce

BCU IASI CENTRALA UNIVERSITY LIBRARY

trebuie colectată şi o metodă pentru îndepărtarea periodică sau continuă a acesteia. Intervalul optim de umiditate relativă pentru stratul de material filtrant este 40-60%.

Asigurarea nutrienţilor

Pe lângă o temperatură optimă şi un mediu umed, microorganismele mai au nevoie de un regim echilibrat de nutrienţi. Poluanţii furnizează sursa principală de hrană şi energie, dar microorganismele necesită pe lângă acestea şi alţi nutrienţi.

Azotul este nutrientul esenţial pentru creşterea microbială. Microorganismele folosesc azotul pentru a construi pereţii celulelor şi pentru a sintetiza proteine şi acizi nucleici. Microorganismele sunt capabile să utilizeze toate formele solubile de azot.

Alţi nutrienţi esenţiali sunt fosforul, potasiul, sulful, magneziul, calciul, sodiul şi fierul. Conţinutul în nutrienţi al unui mediu trebuie verificat periodic.

PH-ul

Cele mai multe biofiltre au performanţele cele mai bune când se operează la un pH al mediului apropiat de 7. Compuşi precum hidrogenul sulfurat, compuşii organici cu sulf şi halogenii (clorul, fluorul, bromul şi iodul) formează în timpul proceselor biologice acizi astfel încât, în timp, pH-ul mediului va scădea.

Pentru rezolvarea problemelor legate de scăderea pH-ului mediilor de filtrare sunt cunoscute câteva tehnici dintre care cea mai simplă presupune montarea a câtorva tuburi de stropire în pereţii stratului filtrant. Periodic o soluţie diluată de carbonat de sodiu anhidru trebuie

BUCUREŞTI UNIVERSITY LIBRARY

introdusă în mediu de cultură în momentul în care pH-ul începe să scadă. O altă tehnică presupune pulverizarea soluției diluate de carbonat de sodiu anhidru pe la partea superioară a biofiltrului. Totuși aceasta metodă este mai puțin eficientă decât cea prin care se udă miezul materialului filtrant prin tuburile de stropire.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BIBLIOGRAFIE

Aamand J., Bruntse G., Jepsen M., Jorgensen C., Jensen B.K., (1995), Degradation of PAHs in soil by indigenous and inoculated bacteria. In *Bioaugmentation for Site Remediation. Pap. 3rd Int.* In Situ *On-Site Bioreclam Symp.* Hinchee, R.E., Fredrickson, J., and Alleman, B.C., Eds. Battelle Press, Columbus, OH. pp. 121–127.

Agarwal A.K., Das L.M., Biodiesel development and characterization for use as a fuel in compression ignition engine. J Eng Gas Turbines Power 2001; 123:440–7.

Agarwal, A.K., Vegetable oil versus diesel fuel: development and use of biodiesel in a compression ignition engine. TERI Inform Dig Energy 1998; 8(3):191–204.

Alexander M. - Biodegradation and Bioremediation, Academic Press, San Diego, 1994.

Al-Garni S.M. - Water SA 2005, 31, 345, disponibil la: http://www.wrc.org.za.

Al-Najar H., Schulz R., Römheld V. - Phytoremediation of Thallium Contaminated Soils by *Brassicaceae*, în: Environmental Chemistry: Green Chemistry and Pollutants in Ecosystems (Ed. Lichtfouse E., Schwarzbauer J., Robert D.), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 2005, 187.

Anghel, I., Constantin, V., Toma, N., Cojocaru, I., - Biologia şi tehnologia drojdiilor, vol.I, Ed. Tehnică, Bucureşti, 1989.

Anghel, I., Vassu, T., Segal, B., Cojocaru, I., - Biologia şi tehnologia drojdiilor, vol.II, Ed. Tehnică, Bucureşti, 1991.

Angrick, M.: Principii si probleme tehnico-procedurale ale epurarii biologice a gazelor reziduale, prin intermediul biofiltrului, Proceedings UTECH '91, Berlin, 08.02.1991

Artenie, V., Tanase, E.,– Practicum de Biochimie generală, Litografia Univ. Al. I. Cuza, Iaşi, 1981.

Atckinson, B., Mavituna, F.,– Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook, The Nature Press, Hong Kong, 1985.

Atlas R.M., Bartha R., *Microbial Ecology: Fundamentals and Applications.* Benjamin/Cummings, Redwood City, CA.1993.

Azarowicz E.M., *Microbial degradation of petroleum,* USA Patent, *No.* 9151835, 1973.

Babel W., Bioremediation of ecosystems by micro-organisms. Approaches for exploiting upper limits and widening bottlenecks. In *Bioremediation: the Tokyo '94 Workshop.* Organization of Economic Co-operation and Development, Paris. pp. 101–115, 1994.

Bailey, J.,E., Ollis, D.F.,– Biochemical Engineering Fundamentals, McGraw – Hill Chemical Engineering Series, New York, 1986.

Bank M., Cunostinte de baza- Tehnologie de mediu, Editura Vogel, 1995.

Barnett, J.A., - The Yeasts, Characteristisc and identification, Cambridge Univ. Press, 1983.

Bartha R., Biotechnology of petroleum pollutant biodegradation. *Microb. Ecol.* 12:155–172. 1986.

Baud-Grasset F., Vogel T.M., Bioaugmentation: biotreatment of contaminated soil by adding adapted bacteria. In *Bioaugmentation for Site Remediation. Pap. 3rd Int.* In Situ *On Site Bioreclam Symp.*. Hinchee, R.E., Fredrickson, J., and Alleman, B.C., Eds. Battelle Press, Columbus, OH. pp.39–48, 1995.

Baudu, M.; Martin, G.; Le Cloirec, P.; Fritsch, G.; Gely, P.: La régénération de tissu de charbon actif (TCA) à l'air chaud, développement semi-industriel, Pollution Atmosphérique, (1990) 3, S. 298 – 305.

Baum, F.: Pastrarea, in practica, a aerului curat, München, 1988.

Baumbach G.: Pastrarea aerului curat, Ed. a 3-a, Editura Springer 1993.

Bio-Wise, Company Publication, "Biological System Reduces VOC Emissions", Bio-Wise, P.O. Box 83, Didcot, Oxfordshire, OX11 OBR, Web Site: www.dti.gov.uk/biowise.

Bisson, L., - The Alcoholic Fermentation, University of California at Davis Univ. Extention, 2001.

Bitir, I., Oportunitatea valorificarii prin cogenerare a biogazului provenit din tratarea deseurilor, Teza de doctorat, Universitatea „Politehnica" Bucuresti, Ianuarie 2002.

Bitir-Istrate, I., Minciuc, E., Valorificarea biogazului pentru producerea energiei electrice si termice, Bucuresti, Editura Cartea Universitara, 2003.

Börger, G.-G.: Emisii mai reduse din adsorbere cu carbune activ, prin regenerare cu vapori mai eficienta, in: Chem.-Ing.-Tech., 64 (1992) 2, S. 200 – 201.

Boyette, R. Allen, Biofiltration Economics and Performance, E & A Consultants, Cary, NC, 2000.

Brauer, M., (Ed.) – Biotechnology, vol. 2, VCH Weinheim, 1985.

Brierley, J.A., Brierley, C.L., 1999. Present and future commercial applications of biohydrometallurgy. In: Amils, R., Ballester, A. (Eds.), Biohydrometallurgy and the Environment Toward the Mining of the 21st Century, Part A. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 81–89.

Briggs, G.G., Bromilow, RH., Evans, A., Relationship between lipophilicity and root uptake and translocation of nonionized chemicals by barley. Pestic Sci 13:495-504, 1982.

Brooks, R.R., Chambers, M.F., Nicks, L.J., and Robinson, B.H. (1998): – Phytomining. Trends in Plant and Science. 1: 359-362.

Bruijnes, C.; Duesmann, H.: Progresul in implementarea masurilor de control a COV, in: Al 6-lea seminar cu tema Tehnologia de control a emisiilor din surse stationare, Budapesta, Ungaria, 14. – 17.10., 1996.

Bryers J.D., Sanin S., Resuscitation of starved ultramicrobacteria to improve *in situ* bioremediation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 745:61-76, 1994.

Buchner, R.; Schmidt, A.; Stefan, K.; Windsperger, A.: Utilizarea biofiltrelor, posibilitati de aplicare si operare practica, Institutul pentru tehnologie metodologica, tehnologia combustibililor si tehnologia de mediu, Wien, 1990.

Bucur N., Lixandru Gh., *Principii fundamentale de ştiinţa solului. Formarea, evoluţia, fizica şi chimia solului,* Ed. Dosoftei, Iaşi, 1997.

Burgeois, C., Leveau, J., - Techniques d'analyse et de controle microbiologique, 2-eme edition, Paris, 1993.

Burgess, J. E, Parsons, S. A., Stuetz, R. M., Developments in Odor Control and Waste Gas Treatment, School of Water Science, Cranfield University, Bedfordshire, UK.

Caşcaval, D.,– Bioinginerie, Litografia U. T., 1998.

Catallo W.J., Portier R.J., , Use of indigenous and adapted microbial assemblages in the removal of organic chemicals from soils and sediments. *Water Sci. Technol.* 25(3):229–237, 1992.

Chaney, R.L., Li, Y.M., Angle, J.S., Baker, A.J.M., Reeves, R.D., Brown, S.L., Homer, F.A., Malik, M. and Chin, M. In Phytoremediation of contaminated soil and water. (ed Terry N. and G. Banelos) – Lewis Publishers, Boca Raton, FL. 129–158, 2000.

Chaudhry, T.M., Hayes, W.J., Khan, A.G. and Khoo, C.S. Phytoremediation - focusing on accumulator plants that remediate metalcontaminated soils. – Australian Journal of Ecotoxicology. 4; 37-51, 1998.

Cheremisinoff, N.,P., Handbook of Pollution Prevention Practices, Marcel Dekker Inc., 2001.

Christman, R., F., - Microbial Degradation and Formation of Humus. In Lignin Occurrence, Formation, Structure and Reaction. Wiley Interscience, New York, 1995.

Cookson, J.T. - Bioremediation Engineering: Design and Application, McGraw-Hill, New York, 1994.

Corseuil H.X., Weber W.J., Jr. Potential biomass limitations on rates of degradation of monoaromatic hydrocarbons by indigenous microbes in subsurface soils. *Water Res.* 28(6):1415–1423, 1994.

Coulson, J. M.,. Richardson, J. F., – Chemical Engineering, vol. 2, Pergamon Press, Oxford, 1978.

Cox, H. J. and Deshusses, Marc A., Waste Gas Treatment in Biotrickling Filter, University of California, Riverside, CA, 2000.

Cunningham, S.D., and Ow, D.W. Promises and prospects of phytoremediation. – Plant Physiol. 110; 715-719, 1996.

Cunningham, S.D., Shann, J.R., Crowley, D., Anderson, T.A., In Phytoremediation of Soil and Water Contaminants. (ed. Krueger, E.L., Anderson, T.A. and Coats, J.P) – American Chemical Society, Washington, DC, 1997.

Da Silva, E.J., 2003. Biotechnology, development and globalization. ASM News 69, 368–369.

Dan, V., Microbiologia produselor alimentare, vol.I, Ed. Alma Galaţi, 1999.

De Salt, Blaylock, M., Nanda Kumar P.B.A., Dushenkov V., Ensley B.D., Raskin I. Phytoremediation: A novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. – Biotechnol. 13: 468-474, 1995.

De Salt, Smith, R.D., Raskin, I., Phytoremediation. – Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49; 643-668, 1998.

Demirbas, Ayhan, Progress and recent trends in biofuels, Progress in Energy and Combustion Science 33 (2007) 1–18.

Deshesses, Marc A., Huub, H. J. Cox, Biotrickling Filter Air Pollution Control, Department of Chemical & Environmental Engineering, University of California, Riverside, CA, 2000.

Devinny, Joseph S., Clearing the Air Biologically, Civil Engineering Magazine, sept. 1998, pp. 46-49.

Devinny, J., Deshuesses, M., Webster, T., "Biofiltration for Air Pollution Control," Lewis Publishers, Boca Raton, 74, 1999.

Doble M., Kruthiventi A.K., Gaikar V.G. - Biotransformations and Bioprocesses, Marcel Dekker, New York, 2004.

Ducreux J., Ballerini D., Bocard C., (1994), The role of surfactants in enhanced *in situ* bioremediation. In *Hydrocarbon Bioremediation.* Hinchee, R.E., Alleman, B.C., Hoeppel, R.E., and Miller, R.N., Eds. CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 237–242.

Dumitrache, M., Stan, C.,– Industria medicamentelor și Biotehnologie farmaceutică – lucrări practice, Litografia U. M. F. Iași, Iași, 2000.

Dunca, S., Ailiesei, O., - Biologia termoactinomicetelor, Ed. Tehnopress, Iași, 2004.

Dybas M.J., Tatara G.M., Knoll W.H., Mayotte T.J., Criddle C.S., (1995), Niche adjustment for bioaugmentation with *Pseudomonas* sp. strain KC. In *Bioaugmentation for Site Remediation. Pap. 3rd Int. In Situ On-Site Bioreclam Symp.* Hinchee, R.E., Fredrickson, J., and Alleman, B.C., Eds. Battelle Press, Columbus, 77.

Ehlers G.A., Rose P.D. –Water SA 2006, 32, 243, disponibil la: http://www.wrc.org.za.

Eigenberger, G.: Purificarea aerului uzat– gaze poluante si mirosuri, raport anual, Colocviu, Universitatea Stuttgart, Germania, 1988

Eisenmann Maschienenbau KG, Böblingen: Tehnologie de mediu: Purificarea aerului uzat, 2001.

Eitner, D.: Biofiltrele in practica, in: Fischer, K. et al.: Purificarea biologica a aerului uzat, Tübingen, 1990

Endt, D. V., Kijne , J. W., Menelink, J.,– Phytochemistry 2002, 61, 107.

Ericsson K, Nilsson LJ. Assessment of the potential biomass supply in Europe using a resource focused approach. Biomass Bioenergy 2006;30:1–15.

Evans G.M., Furlong J.C. - Environmental Biotechnology: Theory and Application, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 2003.

Faaij, APC. Bio-energy in Europe: changing technology choices. Energy Policy 2006; 34(3): 322–42.

Fell, J. W., - The Yeasts, a taxonomic study, Ed. Kreger van Rij, Elsevier, Biomedical Press, Amsterdam, 1984.

Fletcher M., Microbial ecology and bioremediation. In *Bioremediation: the Tokyo '94 Workshop.* Org. Econ. Cooperation Devel., Paris, pp. 109–115. 1994.

Fogarty, W., M., Kelly, C., T., (Ed.) – Microbial Enzymes and Biotechnology, Elsevier Applied Science, London and New York, 1991.

Fontes D.E., Mills A.L., Hornberger G.M., Herman J.S., Physical and chemical factors influencing transport of microorganisms through porous media. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:2473–2481,1991.

Foster R.C., Microenvironments of soil microorganisms. *Biol. Fertil. Soils.* 6:189–203. 1988

Freedman B, Pryde E.H, Mounts T.L., Variables affecting the yields of fatty esters from transesterified vegetable oils. JAOCS 1984; 61:1638–43.

Fritsche W., Hofrichter M. - Aerobic degradation of recalcitrant organic compounds by microorganisms, in: Environmental Biotechnology. Concepts and Applications (Ed. Jördening H.-J., Winter J.), Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2005, 203.

Fritz, W.; Kern, H., Purificarea gazelor reziduale, Würzburg, 1990

Galaction, A., I., Caşcaval, D., - Metaboliți secundari și bioreactoare, Editura Bit, Iași, 2004.

Gannon J.T., Manilal V.B., Alexander M., (1991), Relationship between cell surface properties and transport of bacteria through soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:190–193.

Gavrilă, L., Biotehnologii de depoluare și remediere a solului, in Biotehnologia între știință și artă, Casa Ed. Venus, Iași, 2007.

Giri, A., Dhingra, V., Giri, C. C., Singh, A., Ward, O. P., Narasu, M. L., – Biotechnol. Adv. 2001, 19, 175.

Gleba, D., Borisjuk, N.V., Kneer, R., Poulev, A., Skarzhinskaya, M., Dushenkov, S., Use of plant root for phytoremediation and molecular farming. Proc Natl Acad Sci USA 25:5973-5977, 1999.

Gong, P., Wilke, B., Fleischmann, S., Soil-based phytotoxicity of 2-4-6-trinitrotoluene to terrestrial higher plants. Arch Environ Contam Toxicol 36:152-157.

Gonzaga M.I.S., Santos J.A.G., Ma L.Q. - Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.) 2006, 63, 90.

Gordon, M., Choe, N., Duffy, J., Ekuan, G., Heilman, P., Phytoremediation of trichloroethylene with hybrid poplars. Environ Health Perspect 106:1001-1004,1998.

Gorduza, V., M., ș.a., - Biomateriale, biotehnologii, biocontrol. Editura Cermi, Iași, 2002.

Gratão P.L., Prasad M.N.V., Cardoso P.F., Lea P.J., Azevedo R.A. - Braz. J. Plant Physiol. 2005, 17, 53.

Grosser R.J., Warshawsky D., Robie Vestal J., (1991), Indigenous and enhanced mineralisation of pyrene, benzo(a)pyrene and carbazole in soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:3462–3469.

Hamelinck, CN, Faaij, APC. Outlook for advanced biofuels. Energy Policy; 2006. Online available at www.ScienceDirect.com.

Hanschke, P. A., Jiranek, V., - Yeasts-Metabolism of nitrogen compounds, Wine Microbiology and Biotechnology, 1993.

Hansen, Alan C., Zhang, Qin, Lyne, Peter W.L., Ethanol–diesel fuel blends—a review, Bioresource Technology 96, 277–285, 2005.

Hanson K.G., Desai J.D., Desai A.J., (1993), A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. *Biotechnol. Tech.* 7(10):745–748.

Harrison R., (1999), *Understanding Our Environment. An introduction to Environmental Chemistry and Pollution*, Ediția III, Royal Society of Chemistry.

Hartmeir, W.,- Immobilized Biochatalysts, Springer-Verlag, Berlin, 1988.

Henry J. R. (2000): In An Overview of Phytoremediation of Lead and Mercury. – NNEMS Report. Washington, D.C., 3-9.

Herlitzius, H., Eliminarea solventilor intr-o fabrica de vopseluri tipografice, Documentatia disertatiei UTECH '92, Berlin, 18.02.1992

Herzog, H,; Thissen, N.: Purificarea biologica a aerului uzat pe exemplul fabricarii de lacuri, in: Apa, aer si sol, 3, 1997.

Higgins, I. J., Best, D. J, Jones, J. (Ed.) - Biotechnology Principles and Aplications, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1985.

Hobson, P.N., Production of biogas from agricultural wastes. In Advances in Agricultural Microbiology, Academic Press, New York, 1983.

Huang, J.W., Chen, J., Berti, W.R., and Cunningham, S.D. (1997): Phytoremediation of lead contaminated soils-Role of synthetic chelates in lead phytoextraction. – Environmental Science and Technology, 31; 800-806.

Huang, B., Role of Root Morphological and Phisiological Characteristics in Drought Resistance of Plants, in Plant-Environment Interactions, Marcel Dekker, 2000.

Ionescu C-tin., Ciupariu Dr., Dumitrașcu Gh., (1999), *Poluarea și protecția mediului în petrol și petrochimie,* Ed. Briliant, Buc.

Iordăchescu, D., Dumitru, I. F.,– Biochimie practică, Litografia Universității București, București, 1988.

Jablonkai, I., Komives, T., Boger, P., Chemical catalysis of the isomerisation of peroxidising herbicidal thiadiazolidines. Pesticide Sci 55:657-658, 1999.

Janni, K. A., Maie, W. J., Kuehn, T. H., Bridges, B. B., Vesley, D. and Nellis, M. A., Evaluation of Biofiltration of Air, an Innovative Air Pollution Control Technology, 1996.

Jewell, W.J., Davis, H.R., Gunkel, W., Bioconversion of Agricultural Wastes for Pollution Control and Energy Conservation. U.S. ERDA Report no TID-27164, 1976.

Jobson A., McLaughlin M., Cook F.D., Westlake D.W.S., (1974), Effect of amendments on the microbial utilization of oil applied to soil. *Appl. Microbiol.* 27:166–171.

Kaltschmitt M, Neubarth J. Biomass for energy—an option for covering the energy demand and contributing to the reduction of GHG emissions? In: Workshop Proceedings, Workshop on Integrating Biomass Energy with Agriculture, Forestry and Climate Change Policies in Europe, December 2000. London, UK: Imperial College; 2000.

Kaltschmitt M., Utilization of biomass in the German energy sector. In: Hake J-F, Bansal N, Kleemann M, editors. Strategies and technologies for greenhouse gas mitigation. Aldershot, UK: Ashgate; 1999.

Karim, K., Hoffmann, Rebecca, Klasson, T., Al-Dahhan, M.H., Anaerobic digestion of animal waste: Waste strength versus impact of mixing ", Bioresource Technology, Vol. 96, Issue 16, November 2005, 1771-1781.

Kästner M. - Degradation of aromatic and polyaromatic compounds, in: Biotechnology (Ed. Rehm H.-J., Reed G.), Vol. 11b, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2000.

King, M. B.,: Bott, T. R,. Chami, J. H, - Separation for Biotechnology, Ellis Horwood Ltd., Chichester, 1987.

Kohler, H.: Spalatoare biologice – constructie, variante de procedee, dimensionare, in: Fischer K. (ed.): Purificare biologica a aerului uzat, Ehningen, 1990

Komives T., Gullner, G., Phytoremediation, in Plant-Environment Interaction, Marcel Dekker, 2000.

Kondili, E.M., Kaldellis, J.K., Biofuel implementation in East Europe: Current status and future prospects, Renewable and Sustainable Energy Reviews, 23, 1-15. 2006.

Korma E, Panoutsou K, Kaldellis JK, Tsoutsos Th. Plant biomass management-raw material analysis. NTUA-RENES Unet, In: Proceedings of the second national conference for the Application of Renewable Energy Sources, Athens, Greece; p. 468–73, 2001..

Krill, H.: Tehnologia de control a COV – O privire de ansamblu, in: Al 6-lea seminar cu tema Tehnologia de control a emisiilor din surse stationare, Budapesta, Ungaria, 14. – 17.10.1996

Kupper, H., Zhao, FJ., McGrath, SP., Cellular compartmentation of zinc in leaves of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens.* Plant Physiol 119:305-311, 1999.

Lang E., Malik K.A., (1996), Maintenance of biodegradation capacities of aerobic bacteria during long-term preservation. *Biodegradation.* 7:65–71.

Leavitt M.E., Brown K.L., (1994), Biostimulation vs. bioaugmentation — three case studies. In *Hydrocarbon Bioremediation.* Hinchee, R.E., Alleman, B.C., Hoeppel, R.E., and Miller, R.N., Eds. CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 72–79.

Leeson A., Hinchee R.E. - Principles and Practice of Bioventing, vol. I, II, Battelle Memorial Institute, Columbus, 1996.

Lehninger, A. L.,– Biochimie, Vol. 1, 2, Ed. Tehnică, Bucureşti, 1987.

Leson, G.; Winer, A.M.: Filtrarea biologica: O tehnologie inovatoare pentru tehnologia de control a poluarii aerului in cazul emisiilor de COV, in: Revista Asociatiei pentru managementul poluarii aerului, 41 (1991) 8

Liebe, H.-G.: Biofiltre, eficienta ridicata cu costuri reduse, in: Industria chimica, (1990) 5

Looder, J., - The yeasts. A taxonomic study, North-Holland Publisching Company, second edition, Amsterdam, 1971.

Lovley, D.R., Coates, J.D., 1997. Bioremediation of metal contamination. Curr. Opin. Biotechnol. 8, 285–289.

Ma F, Hanna M.A., Biodiesel production: a review. Bioresour Technol, 1999;70:1–15.

Macoveanu, M., s.a., Impactul compuşilor macromoleculari asupra solului, Ed. Matrix Rom, Bucureşti, 1998.

Mamma, D., Christakopoulos, P., Koullas, D., Kekos, D., Makris, B.J., Koukios, E., An alternative approach to the bioconversion of sweet sorghum carbohydrates to ethanol. Biomass Bioenergy 8 (2), 99–103, 1995.

Mamma, D., Koullas, D., Fountoukidis, G., Kekos, D., Makris, B.J., Koukios, E., Bioethanol from sweet sorghum: simultaneous saccharification and fermentation of carbohydrates by a mixed microbial culture. Process Biochem. 31 (4), 1996, 377–381.

Martin, A., M., - Bioconversion of Waste Materials to Industrial products, Elsevier Applied Science, London and New York, 1991.

Martin, F. Jason, Loehr R. C., Effects of Periods of Non-Use on Biofilter Performance, Journal of the Air and Waste Management Association, Vol. 46, 2003, pp. 534-554.

Masters, G., M.,- Introduction to Environmental Engineering and Science (2-nd ed), Prentice Hall, New Jersey, 2002.

Maxwell C.R., Baqai H.A., (1995), Remediation of petroleum hydrocarbons by inoculation with laboratory-cultured microorganisms. In *Bioaugmentation for Site Remediation. Pap. 3rd Int.* In Situ *On-Site Bioreclam Symp.* Hinchee, R.E.,

Fredrickson, J., and Alleman, B.C., Eds. Battelle Press, Columbus, OH. pp. 129–138.

McInnes, R. G.: Explore New Options for Hazardous Air Pollutant Control, in: Chemical Engineering Progress, November 1995

Merv Fingas, (2000), *The Basics of Oil Spill Cleanup 2nd Edition*, CRC Press, L.L.C., 31–39.

Milică, I., - Biotehnologiile viitorului. Ed. Ion Ionescu de la Brad, Iaşi, 1999.

Mirsal, I.,- Soil Pollution. Origin, Monitoring & Remediation. Springer Ed., 2004.

Mititiuc, M., - Micologie, Ed. Universitatea „Al. I. Cuza", Iaşi, 1995.

Moller J., Gaarn H., Steckel T., Wedebye E.G., Westermann P., (1995), Inhibitory effects on degradation of diesel oil in soil-microcosms by a commercial bioaugmentation product. *Bull. Environ. Contam Toxicol.* 54:913–918.

Moo-Young, M.,. Cooney, Ch. L,. Humphrey, A. E (Ed.) – Comprehensive Bioechnology, vol. 2 şi vol. 3, Pergamon Press, Oxford, 1985.

Mueller, B., Rock, S., Gowswami, Dib, Ensley, D. (1999): Phytoremediation Decision Tree. – Prepared by - Interstate Technology and Regulatory Cooperation.

Muniyappa P.R., Brammer S.C., Noureddini H., Improved conversion of plant oils and animal fats into biodiesel and co-product. Bioresour Technol 1996; 56:19–24.

Murayama T., Fujiwara Y., Noto T., Evaluating waste vegetable oil as a diesel fuel. IMechE 2000:141–8.

Neag Gh., Depoluarea solurilor şi apelor subterane, Casa cărţii de ştiinţă, Cluj-Napoca. 1997.

Nenițescu, C. D., – Chimie organică, vol. 1 şi vol. 2, Ed. Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, 1980.

Nguyen, P.H.L., Kuruparan, P., Visvanathan, C., Anaerobic digestion of municipal solid waste as a treatment prior to landfill, Bioresource Technology, Vol. 98, Issue 2, January 2007, 380-387.

Nicolai, R. E. and Janni, K. A., Development of a Low Cost Biofilter on Swine Production Facilities. ASAE Paper No. 97-4040, 1997, St. Joseph, MI: ASAE.

Noren, O., Design and use of Biofilters for Livestock Buildings. In: Odour Prevention and Control of Organic Sludge and Livestock Farming. eds. V.C. Nielsen, J. H. Voorburg, and P. L'Hermite, 234 – 237, 1985, New York: Elsevier Applied Science Publishers.

Oniscu, C., Caşcaval, D., Horoba, E., Dumitraşcu, A,.– Bioinginerie şi biotehnologii, Litografia U. T. Iaşi, Iaşi, 1999.

Oniscu, C., Caşcaval, D.,– Inginerie biochimică şi biotehnologie. 1. Ingineria proceselor biotehnologice, InterGlobal, Iaşi, 2002.

Oniscu, C., Caşcaval, D.,. Galaction, A.-I.,– Procese biotehnologice. Proteine şi enzime, Litografia U. M. F. Iaşi, Iaşi, 2000.

Parikka, Matti, Global biomass fuel resources, Biomass and Bioenergy 27, 613–620,2004.

Pascal, S., Gullner, G., Komives, T., Scalla, R., Effects of acifluorfen-elicited oxidative stress on glutathione S-transferase enzymes in wheat (*Triticum aestivum*) plants. Z Naturforsch, 29:255-264, 2002.

Perkins, Mark A., Tatem, William R., and James S McMillen, Milti-Faceted Odor Control Program Controls Costs and get results at a Large Regional Wastewater

Treatment Plant, Trinity River (Texas) Authority and Alan Plummer and Associates, Inc.

Peterson C.L., Wagner G.L., Auld D.L., Vegetable oil substitution for diesel fuel. Trans ASAE 1983;26:322–7.

Petrich C.R., Stormo K.E., Knaebel D.B., Ralston D.R., Crawford R.L., (1995), A preliminary assessment of field transport experiments using encapsulated cells. In *Bioaugmentation for Site Remediation. Pap. 3rd Int.* In Situ *On- Site Bioreclam Symp.* Hinchee, R.E., Fredrickson, J., and Alleman, B.C., Eds. Battelle Press, Columbus, OH. pp. 237–244.

Popa, V., I., Spiridon, I., Anghel, N., - Procese biotehnologice în industria de celuloză şi hârtie. Ed. Media Tech, Iaşi, 2001.

Popa, V., I., Rozmarin, Gh., - Tehnologia produselor hidrolitice şi fermentative. Litografia UTI, 1994.

Pramanik, K. Properties and use of Jatropha curcas oil and diesel fuel blends in compression ignition engine. Renew Energy 2003; 28:239–48.

Prasad M.N.V., de Oliveira Freitas H.M. - Electronic Journal of Biotechnology 2003, 6, 3, disponibil la http://www.ejbiotechnology.info/content/vol6/issue3/full/6.

Pritchard P.H., (1992), Use of inoculation in bioremediation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 3:232–243.

Raskin, I. and Ensley, B. D. (2000): Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean Up the Environment. – John Wiley & Sons, Inc., New York., 53-70.

Reeves, R.D., Baker, A.J.M., Metal accumulating plants. In Phytoremediation of Toxic Metals: Using plants to clean up the environment. (ed. Raskin, I. and Ensley, B.) – Wiley, New York, 193-229, 2000.

Rehm, H. J., Reed, G., Puhler, A., Standler, P. ,(Ed.) – Biotechnology, vol. 3, VCH Weinheim, 1993.

Riser-Roberts E., (1998), *Remediation of petroleum contaminated soils. Biological, physical and chemical processes*, CRC Press, Boca Raton, Fl., 94-97.

Rittmann, B., E., McCarty, P.,L.,- Environmental Biotechnology. Principles and Applications, McGraw-Hill Science/Engineering/Math McGraw- Hill,2001.

Robertiello A., Lucchese G., Di Leo C., Boni R., Carrera P., (1994), *In situ* bioremediation of a gasoline and diesel fuel contaminated site with integrated laboratory simulation experiments. In *Hydrocarbon Bioremediation.* Hinchee, R.E., Alleman, B.C., Hoeppel, R.E., and Miller, R.N., Eds. CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 133–140.

Rodriguez L., Lopez-Bellido F.J., Carnicer A., Recreo F., Tallos A., Monteagudo J.M. - Mercury Recovery from Soils by Phytoremediation, `n: Environmental Chemistry: Green Chemistry and Pollutants in Ecosystems (Ed. Lichtfouse E., Schwarzbauer J., Robert D.), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 2005, 197.

Roels, J., - Energetics and Kinetics in Biotechnology. Elsevier, Amsterdam, 1983.

Romich M.S., Cameron D.C., Etzel M.R., (1995), Three methods for large-scale preservation of a microbial inoculum for bioremediation. In *Bioaugmentation for Site Remediation. Pap. 3rd Int.* In Situ *On-Site Bioreclam Symp.* Hinchee, R.E., Fredrickson, J., and Alleman, B.C., Eds. Battelle Press, Columbus, OH. pp. 229–235.

Sanford, C. Wally, Alternative Control Technology for Bakery Oven Emissions, U.S. EPA Report Nos. 453/R-92-017, OAQPS, U.S. EPA, December 1992.

Sawyer, N., C., McCarty, P., L., Perkin, G., F.,- Chemistry for Environmental Engineering and Science, 2003.

Schink B. - Principles of anaerobic degradation of organic compounds, in: Environmental Biotechnology. Concepts and Applications (Ed. Jördening H.-J., Winter, J.), Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2005, 229.

Schneider, M, Margesin R., Schinner F.: Purificarea bio-tehnologica aerului uzat in practica, Editura Springer 1996

Schuchardta U., Serchelia R., Vargas R.M., Transesterification of vegetable oils: a review. J Brazil Chem Soc 1998; 9:199–210.

Schuegerl, K.,– Solvent Extraction in Biotechnology, Springer-Verlag, Berlin, 1994.

Schultes, M.: Purificarea gazelor reziduale; Principii ale metodelor, baze de calcul, comparatie intre procedee, Editura Springer 1996

Scragg, A. H., – Biotechnology for Engineers, Ellis Horwood Ltd., London, 1988.

Scriban, R.,– Biotechnologie, Technique & Documentation, Lavoisier, Paris, 1993.

Seborg, D., E., Edgar, Th. E., Mellichamp, D., A.,- Process Dynamics and Control, J. Wiley & Sons, 2004.

Segura, J., - La fermentation methanique et l'epuration. Biofuture, 1983, vol.10.

Singh, J., Ajay, Owen, P.,- Biodegradation and Bioremediation, Springer Ed., 2004.

Smith, C., A., Corripio, A., B.,- Principles and Practice of Automatic Process Control, J. Wiley & Sons, 1997.

Smith, G., L., Hickey, R., F.,- Biotechnology in Industrial Waste Treatment & Bioremediation, CRC Press, Incorporated, 1995.

Smith, J., Markuszewski, R., Akin, C.,- Gas, Oil & Environmental Biotechnology IV, Institute of Gas and Technology, USA, 1993.

Stanbury, P. F., Whitaker, A., (Ed.) – Principles of Fermentation Technology, Pergamon Press, Oxford, 1986.

Stanlake G.J., Finn R.K., (1982), Isolation and characterization of a pentachlorophenol degrading bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 44:1421–1427.

Stătescu Fl., Chiriac C-tin., (1998), *Bazele ştiinţei solului. Fizica solului*, Ed. Sam-Son's, Iaşi.

Suthersan S.S. - Remediation Engineering: Design Concepts, CRC Press, 1999.

Tănase, C., Micologie. Manual de lucrări practice, Ed. Universităţii „Al. I. Cuza" Iaşi, 2002.

Thra n D, Kaltschmitt M. Biomass for a sustainable energy provision systems– state of technology, potentials and environmental aspects. In: Sayigh A, editor. Workshop Proceedings, World Renewable Energy Congress, June 29–July 5, 2002. Germany: Cologne; 2002.

Topală, N., Kiss, S., Metanogeneza bacteriană in Investigaţii în domeniul energiei, Ed. Dacia, Cluj Napoca, 1982.

Trzesicka-Mlynarz D., Ward O.P., (1995), Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a mixed culture and its component pure cultures, obtained from PAH-contaminated soil. *Can. J. Microbiol.* 41:470–476.

Turco R.F., Sadowsky M., (1995), The microflora of bioremediation. In *Bioremediation: Science and Applications*. Special Pub. 43. Soil Science Society of

America, American Society of Agronomy and Crop Science Society, Madison, WI. pp. 87–102.

Ulrich, M.; Muller, G.: Separarea si recuperarea substantelor din fluxurile de aer uzat , in: Proceedings GVC-VDI-Seminar 'Metode de separare a substantelor in tehnica mediului', Köln, Germania, 4. –5.12.1990

Vallero D.A. - Environmental Contaminants: Assessment and Control, Elsevier, 2004.

Van der Zaal, BJ., Neuteboom, LW., Pinas, JE., Chardonnens, AN.,Overexpression of a novel *Arabidopsis* gene related to putative zinc-transporter genes from animals can lead to enhanced zinc resistance and accumulation. Plant Physiol 119: 1047-1055, 1999.

Van't Riet, K., Tramper, J.,– Basic Bioreactor Design, M. Dekker Inc., New York, 1991.

Vidali M., Bioremediation. An overview, Pure Appl. Chem., vol. 73, No. 7, pp 1163-1172, 2001. .

Viesturs, U., Smite, I., Zileviko, A.,– Biotehnologie, agenţi biotehnologici, tehnologii, aparatură, Ed. Ceres, Bucureşti, 1991.

Vintilă, M., Biogazul, Ed. Tehnică, Bucureşti, 1989.

Voigt, Peter L., Biofiltation for Odor and VOC Control, Clean TeQ Publication, Dandeneng, Victoria, Australia, 2002, 3175.

Volesky, B., Holan, Z.S.,. Biosorption of heavy metals. Biotechnol. Prog., 11235–11250, 1995.

Volf, I., - Biotehnologii în protecţia mediului. Tehnici de control, aplicaţii practice şi numerice. Ed. Cermi, Iaşi, 2004.

Volf, I., Noi tulpini levuriene pentru procese biotehnologice, Ed. Junimea, Iaşi, 2005.

Volf, I., Ecotehnologii, ecoproduse, ecoservicii, Ed. Ecozone, Iaşi, 2006.

Wang, D., I., C.,–Fermentation and Enzyme Technology, John Wiley&Sons, New York, 1979.

Weide, H., Paca, J., Kuorre, W.,– Biotechnologie, VEB Gustav Fisher Verlag, Jena, 1987.

Wilson S.C., Jones K.C., Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAH)s: a review. *Environ. Pollut.* 81:229–249,1993.

Windsperger, A.: Purificarea cu ajutorul biofiltrelor a aerului uzat cu continut de solventi, Partea a 2-a: Calcularea modelului pentru determinarea comportamentului la descompunere, in: Pulberi – Pastrarea aerului curat, (51), 1991.

Wright, J., D., - Ethanol from Biomass by enzimatic hydrolysis. Chemical Engineering Progress, 1998.

Zarnea, G., Tratat de microbiologie generală, vol.I, II, Ed. Acad., Bucureşti, 1984.

Zeisig, H. D., Experiences with the use of Biofilters to Remove Odours from Piggeries and Hen Houses. In: *Volatile Emissions from Livestock Farming and Sewage Operations.* eds. V.C. Nielsen, J. H. Voorburg, and P. L'Hermite, 209 – 216, 1987, New York: Elsevier Applied Science Publishers.

Zhang Q., Odor Production, Evaluation and Control, Department of Biosystems Engineering, University of Manitoba, Oct. 2002.

*** - In Situ Bioremediation: When Does it Work?, National Academy Press, Washington, 1993.

*** - Principles and Practices of Enhanced Anaerobic Bioremediation of Chlorinated Solvents, Parsons Co., 022/738863/28.doc, 2004.

*** Implementarea strategiei de dezvoltare durabilă în domeniul serviciilor publice de management integrat al deșeurilor – Asociația Română de Salubritate – Prima sesiune de dezbatere a strategiei de dezvoltare durabilă a României "Orizont - 2025", București, Palatul Parlamentului, 27 ianuarie 2004

***[VDI 3674]VDI (ED.): Directiva VDI 3674, Purificarea gazului rezidual prin adsorbtie: gaz de proces si purificarea gazelor reziduale – solventi, Düsseldorf, Mai 1998

***Biofuels Research Advisory Council (BIOFRAC), 2006. Biofuels in the European Union: A Vision for 2030 and Beyond. URL: /http://europa.eu.int/comm/research/energy/S (Acc. 2006-03-31)

***Directive 2003/30/EC of the European Parliament and of the Council of 8 May 2003 on the Promotion of the Use of Biofuels or other Renewable Fuels for Transport.

***Directive 2003/96/EC of 27 October 2003 on Restructuring the Community Framework for the Taxation of Energy Products and Electricity.

***Engineered Approaches to *In Situ* Bioremediation of Chlorinated Solvents: Fundamentals and Field Applications, US Environmental Protection Agency, EPA-542-R-00-008, 2000.

***European Biomass Industry Association (EUBIA). Online available at http://www.eubia.org (acc. 2006).

***European Environment Agency (EEA), 2005. How Much Biomass Can Europe Use Without Harming the Environment? URL: /http://www.eea.eu.int/S (Acc. 2006-03-31)

***Eurostat, 2005. Online Statistical Database. URL: /http://epp.eurostat.cec.eu.int/S (Acc. 2005-09-05)

***Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe (FNR) [Agency of Renewable Resources], 2005a, b. Basisdaten Biokraftstoffe [Basic Data on Transport Biofuels]. URL: /http://www.nachwachsende-rohstoffe.de/S (Acc. 2006-03-31)

***Farmacopeea Romană X, Ed. Medicală, București, 1998.

***German Government, 2004a. Erster nationaler Bericht zur Umsetzung der Richtlinie 2003/30/EG [First National Report on the Implementation of Directive 2003/30/EC]. URL: /http://europa.eu.int/S (Acc. 2005-09-05)

***German Government, 2004b. Die Kraftstoffstrategie: Alternative Kraftstoffe und Innovative Antriebe [Transport Fuels Strategy: Alternative Fuels and Innovative Powertrains]. URL: /http://www.bmvbw.de/S (Acc. 2005-09-05);

***MWPS-32, Mechanical Ventilating Systems for Livestock Housing. Ames, IA: MidWestPlan Service. 1990.

***U.S. EPA, (1996), A Citizen´s Guide to Bioremediation, Washington, D.C., EPA/542/F-96/007.

***U.S. EPA, (1999), Monitored Natural Attenuation of Petroleum Hydrocarbon, EPA/600/F-98/021.

***U.S. EPA., (1985), Handbook for Remedial Action at Waste Disposal Sites. Revised. EPA/625/6-85/006.

***United States Protection Agency Reports Introduction to Phytoremediation. – EPA 600/R-99/107, 2000.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

B.C.U. "M. EMINESCU" IASI

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

13260

10

De același autor:

Irina Volf, *Biotehnologii în protecția mediului. Tehnici de control, aplicații practice și numerice.* Ed. Cermi, Iași, 2004

Irina Volf, *Noi tulpini levuriene pentru procese biotehnologice.* Ed. Junimea, Iași, 2005.

Irina Volf, *Ecotehnologii, ecoproduse, ecoservicii.* Ed. Ecozone, Iași, 2006.

ISBN 973-716-768-6

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY